Isolierung und Strukturaufklärung von Keimungsinhibitoren aus den Spelzen von Avena sativa L. und Avena fatua L.

Edith Lohaus

1981

Isolierung und Strukturaufklärung von Keimungsinhibitoren aus den Spelzen von Avena sativa L. und Avena fatua L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Edith Lohaus

aus

Ohrtermersch

München, Mai 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 1981

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger

am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Rüdiger danke ich herzlich für viele wertvolle Ratschläge und Diskussionen und für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Frau I. Blos bin ich für die Anfertigung der Gaschromatogramme, für ihre engagierte Mitarbeit bei der Isolierung der Hemmstoffe sowie für den regen Gedankenaustausch dankbar.

Herrn Dr. W. Schäfer sei herzlich für die Aufnahme der Massenspektren und für die vielen Anregungen bezüglich der Massenspektrometrie gedankt.

Herrn C. Harzer danke ich für seine Hilfe bei den Aufarbeitungen sowie Frau H. Wieschoff für die Durchführung der HPLC - Trennungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die gewährte finanzielle Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen anderen, die mich bei dieser Arbeit freundschaftlich unterstützten. Uwe danke ich für seine Hilfe bei der Reinschrift des Manuskripts.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546818_0054

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
1.	Ursachen und Bedeutung der Keimruhe	1
a)	Wachstum des Embryo	1
b)	Die Rolle der Samenschale	2
c)	Inhibitoren	4
2.	Die Keimruhe von Avena sativa L. und Avena fatua L.	8
II.	AUFGABEN - UND PROBLEMSTELLUNG	11
III.	MATERIAL UND METHODEN	12
A.	Präparativer Teil	
1.	Pflanzenmaterial	12
1.1	Extraktionsmaterial	12
1.2	Im Biotest eingesetztes Pflanzenmaterial	13
2.	Gewinnung von peroxidfreiem Äther	13
3.	Aufarbeitung	14
3.1	Methoden zur Gewinnung des Rohextraktes	14
a)	Avena sativa, im analytischen Maßstab	14
b)	Avena sativa, im präparativen Maßstab	14
c)	Extraktion des Flughafers (Avena fatua)	15
d)	Großaufarbeitung von 25 kg Haferspelzen (A. sativa)	16
3.2	Extraktion bei pH 7	16
3.3	Extraktion bei pH 1	18
3.4	Hydrolyse der " gebundenen " Keimungs-inhibitoren	18
3.4.1	Enzymatische Hydrolyse	18
3.4.2	Chemische Hydrolyse	19
3.4.3	NH_3 - Verseifung	19

4.	Auftrennung der pH 1 - Fraktion mittels Säulenchromatographie	20
4.1	Trennung an Kieselgel	20
4.2	HPLC - Trennung der Nebenfraktion	21
4.3	Auftrennung der pH 1 - Fraktion an Sephadex LH 20	22
a)	Vorversuche im analytischen Maßstab	23
b)	Auftrennung im präparativen Maßstab	23
5.1	Auftrennung des nach NH_3 - Verseifung erhaltenen Extraktes	24
5.2	Dünnschichtchromatographie der in 5.1 erhaltenen Fraktionen	24
6.	Chromatographie der in 4.3 und 5.1 erhaltenen aktiven Fraktionen A, B und E	24
6.1	Rechromatographie an Sephadex LH 20	24
6.2	Gelfiltration an Biogel P 2	25
6.3	Chromatographie an Lichroprep Si 60	25
7.	Methylierung der aktiven Fraktionen	26
7.1	Methylierung mit Diazomethan	26
7.2	Methylierung mit Dimethylsulfat	26
8.	Sublimation	27
9.	Trimethylsilylierung	27
10.1	Chromatographie der durch Sublimation gereinigten Methylester	28
10.2	Präparative Gaschromatographie der pH 1 - - Fraktion von Avena sativa	29
11.	Allgemeines Aufarbeitungsschema	31
12.	Vor- und Nachteile verschiedener Biotests	32
12.1	Biotest mit Avena sativa	32
12.2	Avenakoleoptilzylindertest	34
12.3	Amaranthuskeimtest	38

12.4	Biotest mit der Zellkultur AN 1175 (Pimpinella anisum)	39
III.B.	Analytischer Teil	40
1.	Dünnschichtchromatographie (DC)	40
2.	Infrarotspektroskopie	41
3.	Gaschromatographie	41
4.	Gaschromatographie - Massenspektrometrie (GC - MS)	41
5.1	MS mit Direkteinlaß	44
5.2	Hochauflösende Massenspektrometrie	44
6.	Vergleich der biologisch aktiven Fraktionen mit bereits beschriebenen Keimungsinhibitoren	45
6.1	Isolierung von DMBOA und MBOA aus Zea mays L.	45
6.2	Versuche zum Nachweis von DMBOA, MBOA und BOA in den Spelzen von Avena sativa	46
IV.	ERGEBNISSE	47
1.	Präparative Auftrennung der pH 1 - Fraktion	47
1.1	Säulenchromatographie an Kieselgel	48
1.2	HPLC - Trennung der Nebenfraktion	51
1.3	Chromatographie der pH 1-Fraktion an Sephadex LH 20	55
2.	Untersuchungen zur "freien" und "gebundenen" Form des Keimungsinhibitors	57
2.1	Behandlung der neutralisierten wässrigen Phase nach erfolgter Ätherextraktion bei pH 1	59
2.2	Auftrennung des Ätherextraktes nach Verseifung mit NH_3	62
2.2.1	HPLC	62
2.2.2	Chromatographie an Sephadex LH 20	63
2.2.3	Biotest der Fraktionen A - C mit der Zellkultur AN 1175 (Pimpinella anisum)	64

2.2.4	Untersuchung zum Gehalt der Spelzenextrakte an bereits in der Literatur beschriebenen Wachstums- und Keimungsinhibitoren	66
2.2.4.1	Prüfung der Fraktionen A - I auf Coumarine	66
2.2.4.2	Prüfung der Spelzen von Avena sativa auf ihren Gehalt an Benzoxazolinonen	68
2.2.5	Präparative Trennung an Sephadex LH 20	72
2.2.6	IR - Spektren der aktiven Fraktionen A und B	74
3.	Versuche zur chromatographischen Trennung der in den Fraktionen A und B vorliegenden Carbonsäuregemische	76
3.1	Gelfiltration an Biogel P 2	76
3.2	Chromatographie an Lichroprep Si 60	77
4.	Weitere Behandlung der nach NH_3 - Verseifung und Chromatographie an Sephadex erhaltenen aktiven Fraktion A	77
4.1	Methylierung mit Dimethylsulfat	77
4.2	Methylierung mit Diazomethan	79
4.3	Sublimation der methylierten Fraktion A	82
4.4	GC/MS - Trennung der methylierten, sublimierten Fraktion A	86
5.	Identifizierung des Hemmstoffs	92
5.1	Chromatographie der methylierten, sublimierten Fraktion A an Lichroprep	92
5.2	Strukturbestimmung des Hemmstoffs	99
5.2.1	Bestimmung des Molekulargewichts und der Elementarzusammensetzung	99
5.2.2	Formulierung von 8 möglichen Tricarbonsäuretrimethylestern	104

5.2.3	Struktur des Hemmstoffs " RT 29.5 "	105
5.3	Vergleich der spektroskopischen Daten und der Bioaktivität des Hemmstoffs " RT 29.5 " und eines synthetisierten 1,3,4-Pentantricarbonsäuretrimethylesters	112
6.	Nachweis von keimungshemmenden Substanzen in den Spelzen von Saathafer (A. sativa), der sich im Stadium der sekundären Keimruhe befindet	118
6.1	Isolierung und Identifizierung des Dihydrohämatinsäuretrimethylesters	119
6.2	Untersuchung des Hemmbereichs $\underline{A}_2$ auf Substanzen mit keimungshemmender Wirkung	123
7.	Vergleich der keimungshemmenden Aktivitäten von Avena sativa L. und Avena fatua L.	135
7.1	Hemmaktivitäten nach Ätherextraktion bei pH 7, pH 1 und nach Verseifen der wässrigen Phase mit NH_3	137
7.1.1	pH 7 - Fraktion	137
7.1.2	pH 1 - Fraktion und Ätherfraktion nach Hydrolyse mit NH_3	140
7.2	Chromatographie an Sephadex LH 20	141
7.3	Charakterisierung der wirksamen Komponente der Fraktion $\underline{B}_f$	145
7.3.1	Chromatographie an Lichroprep	145
7.3.2	Präparative Gaschromatographie der Fraktion $\underline{B}_f$	148
7.3.3	GC/MS der Fraktion $\underline{I}_f$	152
V.	ZUSAMMENFASSUNG	159
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	165

I. EINLEITUNG

1. Ursachen und Bedeutung der Keimruhe

Die Keimruhe (englisch: dormancy) stellt eine Verzögerung in der Entwicklung von Samenembryonen, Knospen oder Sporen unter optimalen Bedingungen im Hinblick auf Temperatur, Wasserversorgung und Sauerstoffspannung dar. Erst am Ende dieser Ruheperiode wird die volle Keimpotenz erreicht.
Die Unfähigkeit des ansonsten lebensfähigen Embryos, auszukeimen, kann vielfältige, von Pflanze zu Pflanze unterschiedliche Gründe haben.

a) Wachstum des Embryo

Einige Samen enthalten zum Zeitpunkt des Fruchtfalles nur einen rudimentär ausgebildeten Embryo, der erst während der Nachreifung bei tiefer Temperatur seine endgültige morphologische Gestalt annimmt. Diese Verhältnisse wurden z.B. bei Heracleum spondylium [1) Stokes, 1952] und Panax ginseng [2) Stokes, 1965] gefunden.
In den Samen von Fraxinus excelsior L. ist der Embryo zwar morphologisch vollständig entwickelt, er benötigt aber eine mehrmonatige Lagerung im feuchten Boden; in dieser Zeit findet ein Wachstum des Embryos statt [3) **Villiers,** 1964].
Samen von Rosaceaen (Pfirsich, Kirsche, Apfel) und von Haselnuß(Coryllus avellana) verfallen durch die Reifung in Keimruhe und erlangen ihre Keimfähigkeit erst nach einer Kälteperiode zurück (Stratifikation) [4) Chen, 1973].
Die dabei auftretenden Veränderungen sind chemischer bzw. physiologischer Natur [5) Pollock, 1961].

Vergleicht man Kirschsamen bei verschiedenen Lagertemperaturen, so findet man unterschiedliche Stickstoff- und Phosphorgehalte, Aminosäure- und Enzymzusammensetzungen sowie Gehalte an organischen Säuren [6,7) Pollock, 1959].

b) Die Rolle der Samenschale

Der Embryo ist in vielen Fällen von Fruchtgewebe, Spelzen, Testa und Endospermschichten umgeben. Der Einfluß dieser teilweise sehr harten oder verholzten Strukturen auf die Keimruhe wird oft beschrieben.
Auf Grund des allgemein beobachteten Phänomens, daß die Entfernung der Testa (Schale) von Samen (Verbreitungseinheiten) oder verschiedenartige Beschädigungen gewöhnlich die Keimung induzieren oder stimulieren [8) Ballard, 1973], kommen v.a. Autoren älterer Arbeiten [über Xanthium: 9) Crocker, 1906; 10) Davis, 1930; 11) Shull, 1911; 12) Thornton, 1935; über Avena fatua: 13) Atwood, 1914; 14) Hay, 1962; 15)Berrie,1966] zu dem Ergebnis, die Testa verhindere die Wasser- und Sauerstoffaufnahme des Samens. Eine ausreichende Energie- und Wasserversorgung ist aber Voraussetzung für die bei der Keimung ablaufenden Prozesse der Zellteilung und Zellstreckung, und die Nutzbarmachung der gespeicherten Reserveenergien durch Substrat- und Atmungskettenphosphorylierung setzt in den meisten Fällen eine ausreichende Sauerstoffversorgung voraus.
Barnett [16) 1976] stellt nach Entfernen der Samenschale von Pinus ssp. höhere Raten an Wasser- und Sauerstoffaufnahme fest. Ferner nimmt die Größe des Megagametophyten während der Keimung zu, und die Keimung selbst erfolgt rascher.

Sidhu und Cavers [17) 1977] beobachteten, daß die Samen von Medicago lupulina L., die unter weniger optimalen Bedingungen reifen, eine impermeable Testa ausbilden und strenge Keimruhe zeigen, die über mehrere Jahre andauern kann.
Gegen die Vorstellung einer rein mechanischen Einschränkung der Keimung durch Samenschalenstrukturen sprechen aber z.B. die Untersuchungen von Porter und Wareing [18) 1974] an Xanthium pensylvanicum. Von den beiden in der Frucht vorhandenen Samen zeigt der obere, kleinere keine, der untere dagegen starke Keimruhe. Überführt man die Samen in reinen Sauerstoff, so wird die Keimruhe des unteren aufgehoben. Die Messungen der Sauerstoffaufnahme sowie die Diffusionsrate an O_2 ergaben aber keine Unterschiede zwischen dem oberen und dem unteren Samen. Zum gleichen Ergebnis kommen Thomas, Webb und Wareing bei ihren Arbeiten über Acer pseudoplatanus L. [19,20) 1972]. Die Autoren sehen in Inhibitoren, deren Auswaschen durch die Testa verhindert wird, den Grund für die Keimruhe in Xanthium. Durch kalte Stratifikation soll der Inhibitorgehalt innerhalb des Samens ebenfalls absinken.
Van Staden [21) 1973] macht die von ihm in der Testa von Lactuca sativa gefundenen Polyphenole für deren Wasserimpermeabilität verantwortlich, während die Monomeren als Inhibitoren fungieren können. Auf Grund der Oxidationsempfindlichkeit von Phenolen kann mit Hilfe von Sauerstoff die Inhibitorwirkung behoben oder zumindest herabgesetzt werden.
Nach Whitmore [22) 1974] ist Ferulasäure, ein in vielen Samen vorkommender Keimungshemmstoff [23) Van Sumere et al., 1972], an Kohlenhydrate nichtvaskulärer Zellwände von Triticum sativum - Koleoptilen gebunden und wird dort durch Cellulasen freigesetzt.

c) Inhibitoren

Erste Hinweise über den Einfluß von Wachstumsregulatoren auf Keimung und Keimruhe von Samen kamen von Köckemann [24)1934]. Er entdeckte, daß in den Früchten vorhandene Inhibitoren die Samen am verfrühten Auskeimen hindern. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, daß auch die Samen selbst große Mengen an Inhibitoren, die v.a. in der Samenschale lokalisiert sind, enthalten können [25) Evenari, 1949; 26) Wareing, 1957].

Spätestens mit der Isolierung und Strukturaufklärung des u.a. in Samen von Xanthium und Lactuca sativa vorkommenden Hemmstoffs, der Abscisinsäure, durch Cornforth et al. [27,28) 1965] wurde die große Bedeutung der Keimungshemmstoffe allgemein anerkannt.

Neben Frucht, Samen und Samenschale können auch alle anderen Pflanzenteile wie Wurzel, Stamm, Blätter und Blütenblätter Keimungsinhibitoren enthalten oder ausscheiden; und sie sind im gesamten Pflanzenreich verbreitet [25) Evenari, 1949; 29) Garb, 1961; 30) Hemberg, 1961]. In der Zusammenstellung von Evenari wurden in 101 verschiedenen Pflanzenspezies natürlich vorkommende chemische Substanzen unterschiedlicher Struktur mit wachstums- oder keimungshemmender Wirkung nachgewiesen. Ob sie aber alle eine physiologische Rolle in der Pflanze spielen, ist nicht bekannt.

In den meisten Fällen handelt es sich um relativ einfache Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht [31) Ketring, 1972]. Äthylen, neben Ammoniak, Blausäure, Allylisothiocyanat und einigen hochwirksamen ätherischen Ölen zu den flüchtigen Verbindungen zählend, sollte für die keimungshemmende Wir-

kung des Apfelfruchtfleisches verantwortlich sein [25)]. Äthylen wird aber von keimenden Erdnuß- und Hafersamen freigesetzt, und neuere Untersuchungen haben bestätigt, daß dieses Gas sogar die Keimung verschiedener, sich in Keimruhe befindlicher Samen stimulieren kann.(Ein Beispiel für inhibierende auf der einen, stimulierende Wirkung auf der anderen Seite, hervorgerufen durch ein und dieselbe Substanz) [32) Esashi, 1969; 33) Ketring, 1969; 34) Stewart, 1969]. Aldehyde (acyclische wie Citral, aromatische wie Zimtaldehyd), Phenole (Hydroxybenzoesäure, Salicylsäure, Gallussäure), Alkaloide (Coffein, Cocain), Zimtsäurederivate (freie ungesättigte Säuren, Zimt-, Kaffee-, Ferulasäure), ungesättigte Lactone (Coumarin, Scopoletin, Xanthotoxin, Parascorbicsäure) und organische Säuren sind weitere Beispiele für natürlich vorkommende Keimungsinhibitoren [Zusammenfassung in 31) Ketring, 1973]. Von den gesättigten Fettsäuren zeigen die Vertreter mit 7, 8 und vor allem 9 und 10 C-Atomen die größte Wirkung [35) Berrie, 1979].

Daneben wird der hemmende Einfluß von β-Hydroxycarbonsäuren, v.a. β-Hydroxydecansäure (Myrmicacin) auf Pollen- und Samenkeimung beschrieben [36) Iwanami, 1979]. Auch Aminosäuren und deren Gemische sowie β-Aminopropionitril sollen Aktivität zeigen [37) Niemann, 1952; 38) Wilson, 1978]. Gerbstoffe wurden schon im Zusammenhang mit der Rolle der Samenschale erwähnt.

Diese Aufzählung enthält nur die wichtigsten Verbindungsklassen und ist bei weitem nicht vollständig; völlig unberücksichtigt bleibt auch die große Anzahl an synthetischen Wachstumsregulatoren, die v.a. in der gärtnerischen und landwirtschaftlichen Praxis erhebliche (teils zweifelhafte)

Bedeutung erlangt haben.

Die Erkenntnisse über Struktur/ Wirkungs- und Wirkstoff/ Rezeptorbeziehungen sind bisher noch gering [39 Schreiber, 1976]. Die vorher aufgeführten gesättigten Fettsäuren enthalten wie Abcisinsäure eine Carboxylfunktion, die mit den Cholin- und Äthanolamingruppen der Lipide in der Membran reagieren soll, ihr nichtpolarer Anteil bildet Anlagerungskomplexe mit den langkettigen, gesättigten Fettsäuren [40) Khan, 1973]. Ungesättigte Lactone und Coumarine reagieren mit den SH-Gruppen von Enzymen [92) Thimann, 1949].

Nach den Untersuchungen von Schreiber [39) 1976] ist es bedingt möglich, bei bestimmten chemischen Grundstrukturen theoretische Voraussagen über deren biologische Aktivität zu machen; z.B. scheinen α-Methylen-γ-lacton - Gruppierungen oder die Lunularsäure (Dihydrostilbencarbonsäure), die in Lebermoosen und Algen nachgewiesen wurde, essentielle Strukturelemente zu sein und können als Synthesemodelle für die Auffindung neuer biologischer Wirkstoffe dienen.

Viele Inhibitoren fungieren als Antagonisten von Wachstumsregulatoren wie Auxinen (Indolessigsäure = IES),Gibberellinen = GA und Cytokininen. Eine durch IES hervorgerufene Wachstumsförderung wird kompetitiv durch t-Zimtsäure gehemmt, die die IES von ihrer Proteinbindungsstelle verdrängt [41) Van Overbeck, 1951]. Im Gegensatz zu den Gibberellinen und Cytokininen hat aber die IES wenig Einfluß auf die Samenkeimung [32) Esashi, 1969; 33) Ketring, 1970]. Eine Stimulierung der Samenkeimung durch Gibberellin kann durch Abscisinsäure und Coumarin unterdrückt werden;

und zwar soll die durch GA induzierte Bildung einer für die Synthese von α-Amylase notwendigen RNA gehemmt werden [42) Chrispeels, 1967; 43) Knypl, 1969]. Daneben wurde eine Unterdrückung der Nucleinsäure- und Proteinsynthese beobachtet [Zusammenfassung in 31) Ketring, 1973].

Aus den bisherigen Untersuchungen geht hervor, daß das Auftreten der Keimruhe in den Samen und deren Aufhebung auf dem Zusammenwirken von keimungsfördernden und -hemmenden Substanzen beruht [44) Wareing, 1971; 45) Taylorson, 1977; 4) Chen, 1973].

Keimungsinhibitoren sind zum großen Teil nicht artspezifisch, d.h. ein Hemmstoff kann die Keimung mehrerer Arten beeinträchtigen. Einigen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen kommt keine endogene regulatorische Funktion zu, sie weisen aber nach exogener Applikation, in Form der wässrigen Extrakte, wachstumsretardierende oder keimungshemmende Eigenschaften auf. Die Empfindlichkeit verschiedener Samen gegenüber der gleichen Hemmstoffkonzentration variiert sehr.

Zu den physiologischen Wirkungen der Hemmstoffe gehören osmotische Einflüsse, pH-Änderungen und Beeinträchtigung der Atmung über eine Hemmung der Oxidasen, obwohl dadurch auch die Keimung sich in Keimruhe befindender Samen stimuliert werden kann [46) Major, 1968]. Es wurden Änderungen der Membranpermeabilität beobachtet; ob Wachstumsregulatoren aber generell, wie bei den Fettsäuren und Abscisinsäure beschrieben, über eine Reaktion mit der Zellmembran wirken, konnte bisher nicht hinreichend bewiesen werden [31) Ketring, 1973].

Auf Grund ihrer Fähigkeit, die Samenkeimung in der Frucht vor der Reife zu verhindern, die Keimung und das Wachstum der eigenen sowie anderer Arten zu unterdrücken und die Keimfähigkeit über einen langen Zeitraum zu erhalten und auf diese Weise die Samenverbreitung und Überlebensrate der Arten zu bedingen, sind die Inhibitoren von großer biologischer Bedeutung.

2. Die Keimruhe von Avena sativ L. und Avena fatua L.

Frisch geerntete Samen von Avena fatua (Flughafer) befinden sich in Keimruhe. Erst nach einer mehrmonatigen, trockenen Lagerung erlangen sie ihre Keimfähigkeit zurück; d.h. sie durchlaufen einen Nachreifungprozeß.

Da der Flughafer bei ungenügender Feuchtigkeitszufuhr Jahre, sogar Jahrzehnte im Boden ruhen kann, um dann in nassen Jahren spontan auszukeimen, stellt er ein schwer zu bekämpfendes Unkraut dar.

Die Stärke dieser Keimruhe bei den Poaceae, zu denen Avena sativa und fatua zählen, hängt von äußeren Bedingungen während der Reifung der Samen wie Lichtintensität, Temperatur und Wasserversorgung ab [47) Owen, 1956; 48) Stajkow, 1959; über Braugerste: 49) Ludwig, 1963; über Weizen: 50) Belderock,1961]. Feuchte Jahre mit geringer Strahlung und niedrigen Temperaturen führen zu einer starken Ausbildung der Keimruhe.

Während der Nachreifung sind Atmungsprozeß und Proteasenaktivität gesteigert; Acidität und Wasserbindungsvermögen nehmen zu [51) Atwood, 1914]. Nach Atwood ist der Sauerstoff der limitierende Faktor bei der Keimung von frisch geernteten Samen von Avena fatua;

entweder es nimmt der Sauerstoffbedarf des Embryos während der Nachreife ab, oder eine Zunahme der Permeabilität der Samenschale bedingt eine bessere Keimfähigkeit.
Isolierte Embryonen aus sich in Keimruhe befindenen Karyopsen von Avena fatua können auf einem Nährmedium, das Saccharose, Aminosäuren und Gibberellinsäure enthält, zum Auskeimen gebracht werden [52) Simpson, 1965]. Aber auch allein durch Entfernen der Spelzen läßt sich die Keimrate erheblich erhöhen [53) Zade, 1909; 54) Kießling, 1911; 55) Black, 1959; 56) Kommedahl, 1958]. Nach Black verhindern die Spelzen weder den Gasaustausch noch unterbinden sie die Wasseraufnahme durch die Karyopsen; er vermutet, daß sich in den Karyopsen ein oder mehrere Hemmstoffe befinden, deren Auslaugen durch die Spelzen verhindert wird. Er kann aus wässrigen Extrakten der Samen zwei Hemmfraktionen identifizieren, macht aber über die chemischen Strukturen der Hemmstoffe keine Aussagen.
Kommedahl [56)] begießt Karyopsen mit einem Extrakt aus Spelzen von Avena fatua und erzielt ebenfalls eine Keimungshemmung. Auch er vermutet einen wasserlöslichen Inhibitor.
Zu dem gleichen Ergebnis kommen Elliot und Leopold [57)] bei ihren Untersuchungen an Avena sativa. Der von ihnen angereicherte Hemmstoff inaktiviert die Amylasen, und zwar die α-Amylasen stärker als die β-Amylasen und verliert nach Behandlung mit Papain seine Aktivität. Nach den Aussagen der Autoren könnte es sich um ein Polypeptid handeln.
Berrie [35) 1979] stellt eine Korrelation zwischen der Dauer der Keimruhe bei Avena fatua und dem Gehalt der Spelzen an niederen Fettsäuren fest. Der Verlust dieser flüchtigen

Fettsäuren während der Lagerung soll für die Aufhebung der Keimruhe verantwortlich sein.

In weiteren Arbeiten werden Aminosäuren [37) Niemann, 1952] Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäure [58-60) Börner, 1956/1957] als Inhibitoren, die mit Wasser aus den Spelzen von Avena sativa extrahiert wurden, beschrieben.

Börner identifiziert dünnschichtchromatographisch 4-Hydroxy-Benzoesäure, Vanillinsäure, p-Cumarsäure und Ferulasäure. Später kommen noch Syringasäure [91) Smith, 1958], Sinapinsäure, Protocatechusäure und Kaffeesäure [61) Herrmann,1958] hinzu. Der endogen in den Spelzen vorhandene Pool dieser Säuren (p-Cumarsäure: 4.647 mg; p-Hydroxybenzoesäure: 0.829 mg; Vanillinsäure: 0.724 mg; Ferulasäure: 1.321 mg; alle Werte bezogen auf einen Extrakt aus 60 g Haferspelzen) reicht aber nicht aus, um die auftretende Hemmung zu erklären [62) Karl, 1979]. Zu dem gleichen Ergebnis bezüglich der Aminosäuren kommt Karl nach der quantitativen Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung.

Nach seinen Untersuchungen handelt es sich bei den keimungshemmenden Substanzen in wässrigen Spelzenextrakten von Avena sativa und A. fatua um hitzestabile, niedermolekulare Verbindungen, die sich im Sauren mit Äther extrahieren lassen und die die Keimung der Samen sowohl von monokotylen als auch von dikotylen Pflanzen unterdrücken.

II. AUFGABEN- UND PROBLEMSTELLUNG

Die im folgenden dargelegte Arbeit ist als Weiterführung der oben erwähnten Untersuchungen von R.Karl [62)] angefertigt worden. Da die Aussagen früherer Autoren über die chemischen Strukturen der Hemmstoffe aus Avena sativa und Avena fatua nicht bestätigt werden konnten, sollte es sich um bisher als Hemmstoffe nicht beschriebene Verbindungen handeln.

Die von Karl mittels Ausschütteln bei verschiedenen pH--Werten erhaltenen Fraktionen sollten weiter aufgereinigt, die Inhibitoren isoliert und ihre chemischen Strukturen aufgeklärt werden. Da die Hauptaktivität in der Ätherphase nach Hydrolyse der wässrigen Phase mit NH_3 gefunden wurde, bot es sich an, diese bevorzugt zu untersuchen.

Um die Effektivität eines jeden Reinigungsschrittes zu erfassen, war es notwendig, jede neu gewonnene Fraktion einem biologischen Test zu unterwerfen. Der ebenfalls von Karl ausgearbeitete Biotest mit Karyopsen von Avena sativa als Testsaatgut wurde zu diesem Zweck für die anfänglich durchgeführten Versuche übernommen. Bei fortschreitender Anreicherung erwies es sich als sinnvoller, einen Biotest mit Amaranthus caudatus als Testsaatgut zu verwenden.

Zur Absicherung der ermittelten Strukturen wurden Syntheseversuche durchgeführt und die synthetischen Verbindungen im Biotest zum Vergleich zu den natürlichen Verbindungen ebenfalls auf Hemmwirkung geprüft.

III. MATERIAL UND METHODEN

A. Präparativer Teil

1. Pflanzenmaterial

1.1 Extraktionsmaterial

a) Saathaferspelzen (Avena sativa L.), Gemisch, gereinigt; bezogen von der Fa. Maizena, Heilbronn.

b) Saathafer der Sorte " Flemings Krone ", Ernte 1980; dieser wurde für die Vorversuche von Hand entspelzt. Für die Aufarbeitung wurden die Spelzen durch grobes Zerkleinern der Körner im Waring (commercial) blender und anschließendes Windsichten mit Hilfe eines Astron von den Karyopsen befreit.

c) Flughafer (Avena fatua L.), geerntet 1979. Der Flughafer wurde bis zur Aufarbeitung im Tiefkühlschrank gelagert, um einen Abbau des Hemmstoffs zu verhindern. Aufgearbeitet wurden Spelzen und Karyopsen.

d) Mais (Zea Mays L.), Sorte " Garbor ". Das gebeizte Saatgut mußte 24 Stunden unter fließendem Wasser gewaschen werden, um eine gute Keimrate zu erzielen. Für die Aussaat wurden 3 l Vermiculith in eine Plastikwanne (50 x 40 cm) gefüllt, 2 l Wasser zugesetzt und die Samen gleichmäßig darauf verteilt. Das Auskeimen erfolgte im Brutschrank (Eigenbau, Bot. Institut, Universität München) bei 27°C und 90 % Luftfeuchtigkeit. Verwendung fanden die 4 Tage alten, etiolierten Koleoptilen.

1.2 Im Biotest eingesetztes Pflanzenmaterial

a) Saathafer (Avena sativa L.) Sorte " Husar " der Fa. BayWa, München, per Hand entspelzt.

b) Fuchsschwanz (Amaranthus caudatus L.) der Fa. Bayerische Saatbauvereinigung, Ismaning.

c) Weizen (Triticum aestivum L.), ungebeiztes Saatgut. Aussaat wie unter 1.1.d) bei Mais beschrieben. Für den Biotest wurden die 3 Tage alten, etiolierten Koleoptilen verwandt.

d) Zellkultur AN 1175 (Pimpinella anisum L.)

2. Gewinnung von peroxidfreiem Äther

Der zur Extraktion von Haferspelzenextrakten bei verschiedenen pH-Werten verwandte peroxidfreie Äther wurde nach der Methode von Larson [63) 1955] gewonnen. Hierzu wurde 1 l technischer Äther mit 0.5 g fein zerstoßenem Calciumoxid und 2.5 g Eisen-II-sulfat und ca. 25 ml dest. H_2O 3 Minuten lang kräftig geschüttelt, dann die grau- bis graugrüne (bei starker Verunreinigung braune) wässrige Phase verworfen. Nach insgesamt dreimaligem Ausschütteln wurde der Äther über eine Kolonne destilliert, 50 ml Vorlauf und die letzten 100 ml verworfen.

Zur Herstellung absoluten Äthers wurde die Hauptmenge des Wassers im Tiefkühlfach ausgefroren, danach frisch geschnittenes, drahtförmig gepreßtes Natrium als Trockenmittel zugesetzt.

3. Aufarbeitung

3.1 Methoden zur Gewinnung des Rohextraktes

a) Avena sativa, im analytischen Maßstab

120 g gereinigte Haferspelzen werden mit 1 l bidest. Wasser versetzt und 1 Stunde (vom beginnenden Sieden) am Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen werden die Spelzen mit Hilfe eines Haarsiebes vom Extrakt getrennt, kleinere Partikel in der Kühlzentrifuge (G 50 K, Fa. WKF, Brandau, Odenwald) bei 10 000 Upm = 18 000 g 20 min. lang abzentrifugiert (500 ml - Stahlbecher). Der Rückstand wird verworfen, das Volumen des Überstands bestimmt, da es als Bezugsbasis für die biologischen Tests (s. unter 12.), die sich an jeden Trennungs- und Aufreinigungsschritt anschließen, dient.
Um große Volumina bei der weiteren Aufarbeitung zu vermeiden, wird der Rohextrakt gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage L 2, Fa. WKF, Brandau, Odenwald) und das Lyophilisat für die nächsten Trennungsschritte in 100 ml bidest. Wasser resuspendiert.
Der unlösliche Rückstand wird in der Tischzentrifuge (Typ Junior I, Fa. Christ, Odenwald, Harz) bei höchster Drehzahl abzentrifugiert.

b) Avena sativa, im präparativen Maßstab

Zur Gewinnung größerer Mengen des Rohextraktes wurde ein vereinfachtes Verfahren verwandt.
Hierzu werden 100 g Haferspelzen in eine 500 ml fassende Soxhletapparatur gefüllt (Extraktionshülsen Schleicher und Schüll Nr. 603, 47.5 x 200 mm) und mit 500 ml bidest. Wasser 12 Stunden extrahiert.

Der so gewonnene Rohextrakt wird direkt weiter aufgearbeitet. Der Rohextrakt der Saathaferspelzen der Sorte " Flemings Krone " wurde ebenfalls nach dieser Methode gewonnen.

c) Extraktion des Flughafers (Avena fatua)

Die mechanische Trennung von Spelzen und Karyopsen bei Avena fatua erwies sich als schwierig. Die im Vergleich zu A. sativa kleineren Karyopsen sind fest von stark behaarten Spelzen, an deren Ende eine lange Granne sitzt, umgeben (Gewichtsverhältnis Spelze : Karyopse = 1 : 1). Die mechanische Festigkeit der Spelzen machte auch ein gutes Zerkleinern unmöglich. Daher wurden Spelzen und Körner (grob zerkleinert) aufgearbeitet. Die Körner enthalten 10 % Rohprotein, 5 % Fett und Saponine. Die Saponine zeichnen sich durch ihre Grenzflächenaktivität aus. Behandelt man einen Methanol - Extrakt von Hafermehl mit Äther, so bilden sich äußerst stabile Emulsionen. Erst nach mehrtägigem Stehen tritt völlige Entmischung ein [64) Mohr, 1953]. Diese Substanzen verhindern bei der Extraktion mit Äther bei pH 1 und pH 7 die Phasentrennung und sind daher unerwünscht. Um die Konzentration der oben genannten Inhaltsstoffe gering zu halten, wurde die Extraktion der Spelzen und Karyopsen von Avena fatua in einer Soxhletapparatur durchgeführt (s. unter 3.1.b)).

d) Großaufarbeitung von 25 kg Haferspelzen (A. sativa)

Das Ausgangsmaterial wurde in Portionen von je 2 kg in 15 l fassende Glasflaschen gefüllt, mit 11 l bidest. Wasser versetzt und im Dampfdruckverfahren bei 120°C und 2 bar im Autoklaven (Vapoklav 400 E, Fa. Sterico) 2 Stunden extrahiert. Der Extrakt wurde durch ein Leinentuch filtriert und Restwasser mit Hilfe einer Weinpresse aus den Spelzen entfernt. Es wurden ca. 8 l wässrige Lösung erhalten, die am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 2.5 l eingeengt und anschließend gefriergetrocknet wurden. Das Lyophilisat wurde in 3 - 4 l bidest. Wasser resuspendiert, der unlösliche Rückstand 30 Minuten bei 8 000 UpM = 14 500 g abzentrifugiert (1 l - Stahlbecher). Dieser Vorgang wurde nochmals mit 1 l bidest. Wasser wiederholt, die vereinigten Überstände dann der Ätherextraktion bei pH 7 und pH 1 unterworfen.

3.2 Extraktion bei pH 7

Die nach den unter 3.1 beschriebenen Extraktionsverfahren gewonnenen Rohextrakte wurden mit 1 N - $NaHCO_3$ auf pH 7 eingestellt (um bei der Großaufarbeitung die ohnehin schon großen Volumina möglichst gering zu halten, wurde dort gesättigte $NaHCO_3$ - Lösung verwandt) und folgendermaßen mit Äther extrahiert:

a) Bei dem Rohextrakt, erhalten aus 120 g Saathaferspelzen mittels Kochen am Rückfluß: 3 x ausschütteln mit je 150 ml Äther.

b) Beim Rohextrakt aus 120 g Saathaferspelzen mittels Soxhletapparatur: Das größere Volumen des wässrigen

Extraktes (750 - 800 ml) erfordert die Verwendung von 3 x 250 ml Äther, um eine Phasentrennung zu erzielen.

c) Beim Rohextrakt aus 120 g Spelzen und Karyopsen aus Avena fatua: Aus den unter 3.1.c) aufgeführten Gründen ist eine Ätherextraktion durch Ausschütteln im Scheidetrichter kaum möglich. Es bilden sich stabile Emulsionen, die durch Zugabe geringer Mengen Methanol oder Aceton oder durch Zentrifugation nicht zerstört werden können. Der wässrige Extrakt wird in einen 1 l - Perforator überführt, als Vorlage dient 500 - 600 ml Äther. Die Extraktion ist abgeschlossen, wenn der ätherische Überstand nicht mehr gefärbt ist.

d) Bei der Großaufarbeitung wird der nach der Extraktion von 2 kg Haferspelzen gewonnene Rohextrakt (5 l) auf einen 3 l und zwei 1 l fassende Perforatoren verteilt und 48 - 96 Stunden extrahiert (der ätherische Überstand sollte farblos sein).
Die Vorlagen können bei der folgenden Extraktion erneut verwandt werden. Beginnen sich die extrahierten Substanzen am Kolbenrand abzusetzen, wird frischer Äther eingesetzt. Die vereinigten Ätherphasen werden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt (dabei läßt sich der Äther zurückgewinnen), die Rückstände im Biotest auf Hemmaktivität geprüft.

3.3 Extraktion bei pH 1

Die nach der Ätherextraktion bei pH 7 verbleibende wässrige Phase wird mit konzentrierter H_2SO_4 (ca. 95 - 97 %ig) unter Eiskühlung auf pH 1 eingestellt und wie unter 3.1.a)-d) beschrieben mit Äther extrahiert. Der Äther wird am Rotationsverdampfer entfernt. Alle bei pH 1 mit Äther extrahierbaren Substanzen werden als pH 1-Fraktion bezeichnet.

3.4 Hydrolyse der " gebundenen " Keimungsinhibitoren

3.4.1 Enzymatische Hydrolyse

Die wässrige Phase nach Ätherextraktion bei pH 1 wird mit $Ba(OH)_2$ neutralisiert und das entstandene $BaSO_4$ 10 Minuten bei 10 000 UpM = 18 000 g abzentrifugiert. Die enzymatische Hydrolyse wird durchgeführt:

a) durch Zugabe von 0.1 ml α-Glycosidase, 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur,

b) durch 2 - stündige Vergärung mit 5 g Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae) bei 28°C,

c) unter Verwendung des synthetischen Enzymgemisches EL 44 - 78 (Fa. Röhm), das Glycosidase-, Esterase- und Pektinaseaktivität aufweist. Die neutralisierte wässrige Phase wird mit 5 %iger H_2SO_4 auf pH 4.3 eingestellt und 20 Stunden bei 45°C mit 1 g Enzymgemisch inkubiert. Dann wird, um die Enzyme zu inaktivieren, 5 Minuten am Rückfluß gekocht und danach das ausgefallene Protein abzentrifugiert.

3.4.2 Chemische Hydrolyse

Die nach obiger Beschreibung neutralisierte wässrige Phase wird:

a) 1 Stunde mit 50 ml 1 N-H_2SO_4 am Rückfluß gekocht

b) 1 Stunde mit 100 ml 1 N-NH_3 bei Raumtemperatur gerührt.

Diese Vorversuche wurden jeweils mit einem wässrigen Extrakt aus 60 g Haferspelzen, der bei pH 7 und pH 1 mit Äther extrahiert wird, durchgeführt. Nach erfolgter Hydrolyse werden die Proben mit 5 %iger H_2SO_4 auf pH 1 gebracht, 3 x mit je 100 ml Äther extrahiert, die vereinigten Extrakte am Rotationsverdampfer eingeengt und die jeweiligen Rückstände im Biotest auf ihre keimungshemmende Wirkung getestet.

3.4.3 NH_3 - Verseifung

Befriedigende Ergebnisse lieferte folgendes Verfahren: Die wässrige Phase wird direkt von pH 1 mit 33 %iger NH_3 - Lösung auf pH 11 gebracht und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird der pH vorsichtig unter Eiskühlung auf 1 eingestellt und die Lösung nach dem Abkühlen mit Äther extrahiert.

4. Auftrennung der pH 1 - Fraktion mittels Säulenchromatographie

4.1 Trennung an Kieselgel

Die pH 1-Fraktion wird gefriergetrocknet, um letzte Wasserspuren zu entfernen; danach in 3 ml Fließmittel gelöst und an einer Kieselgelsäule aufgetrennt.

Säule: Glassäule 45 x 5 cm

Füllmaterial: Während der Vorversuche wurde Kieselgel Si 60 (0.063 - 0.200 mm, Merck Nr. 7754), zur präparativen Auftrennung aber Lichroprep Si 60 (15 - 25 µ, Merck Nr. 9336), das auf Grund seiner geringen und einheitlichen Korngröße eine schärfere Trennung versprach, verwandt.

Füllen der Säule: Das Material wird 20 Stunden bei 140°C im Trockenschrank aktiviert, nach dem Abkühlen in einem Jodzahlkolben so lange mit der notwendigen Menge des Elutionsmittels geschüttelt, bis ein dünnflüssiger Brei entsteht, der direkt in die Säule eingefüllt wird.

Füllhöhe: 30 cm

Elutionsmittel: Benzol : Methanol : Eisessig = 40:5:2

Durchflußrate: 1 ml/min

Nach ca. 48 Stunden ist die Trennung beendet. Die Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch auf HPTLC - - Platten (Merck Nr. 5631) identifiziert, als Fließmittel wird ebenfalls das oben erwähnte Gemisch verwandt.

Von jeder 2. Fraktion werden 10 µl aufgetragen, die Detektion erfolgt durch Ansprühen mit Anisaldehyd/H_2SO_4 (Stahl Nr. 15). Anschließend wird 10 Minuten bei 120°C entwickelt.

Bei der Auftrennung an Kieselgel wurden zwei Fraktionen isoliert (der mit Methanol von der Säule eluierte Rückstand verworfen), eine mit Anisaldehyd rot anfärbbare Hauptfraktion, bei der es sich um p-Cumarsäure handelt, und eine blau anfärbbare sogenannte Nebenfraktion, die die biologische Aktivität enthielt (Identifizierung der p-Cumarsäure s. unter: Dünnschichtchromatographie).

4.2 HPLC - Trennung der Nebenfraktion

Die weitere Auftrennung der Nebenfraktion erfolgte mit Hilfe der präparativen Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

Geräte:	HPLC Waters System, Modell 6000 A (2 Pumpen); Modell U 6 K (Injektor); LDC - Modell 1202 (variabler Wellenlängen - Doppelstrahldetektor)
Säule:	250 x 20 mm, Stahl
Säulenmaterial:	Lichroprep 5 - 20 µm RP 8 (Fa. Knauer)
Detektion:	Messung der Absorption bei 280 nm
Durchflußrate:	4.0 ml/min
Elutionsmittel:	Methanol/ Wasser
Gradient:	von 70 T. Wasser/ 30 T. Methanol auf 50 T. Wasser/ 50 T. Methanol, nach 10 Minuten auf 100 % Methanol.

Die Nebenfraktion wird in 1 ml Methanol gelöst und evtl. vorhandene Trübungsstoffe durch Filtration über Watte entfernt.

Eingespritzte Menge pro Trennungsgang: 50 µl.

Das Eluat fängt man fraktionsweise in Vorratsgefäßen auf, entfernt das Methanol am Rotationsverdampfer sowie das Wasser mittels Gefriertrocknung und testet die einzelnen Fraktionen im Biotest auf ihre biologische Aktivität.

4.3 Auftrennung der pH 1 - Fraktion an Sephadex LH 20

Bei Sephadex LH 20 handelt es sich um ein Dextrangel, dessen freie OH - Gruppen mit Propylalkohol veräthert sind. Die einzelnen Ketten bilden durch Verknüpfung untereinander ein dreidimensionales Netz. Die Auftrennung erfolgt teilweise nach dem Prinzip der Verteilung, teilweise durch Adsorption. Nach Untersuchungen von Brook und Munday [65) 1970] werden Phenole, Phenolcarbonsäuren, Benzoesäurederivate und Halogenverbindungen stark an Sephadex LH 20 adsorbiert.

An Sephadex LH 20 wurden die pH 1-Fraktion aus Avena sativa und A. fatua sowie die Ätherphase pH 1 nach Hydrolyse der wässrigen Phase (A. sativa und A. fatua) aufgetrennt. Nach einer von Karl [62) 1979] durchgeführten gaschromatographischen Analyse enthält die pH 1-Fraktion, bezogen auf 60 g Haferspelzen, 7.5 mg Phenolcarbonsäuren (davon 60 % p-Cumarsäure), die bevorzugt durch die Auftrennung an Sephadex LH 20 zurückgehalten werden sollten.

a) Vorversuche im analytischen Maßstab

Säule:	Glassäule 30 x 2.5 cm
Füllhöhe:	25 cm
Säulenmaterial:	Sephadex LH 20
Detektion:	Messung der Absorption bei 280 nm
Geräte:	Durchflußspektrometer " Spectrochrom M " Fa. Gilson Schreiber Modell 260/MM (Fa. Abimed) Fraktionssammler Modell MTDC (Fa. Gilson)
Elutionsmittel:	50 ml H_2O, 100 ml H_2O/MeOH = 50/50 Die Säule wird nach beendeter Trennung mit Methanol gespült, um das Säulenmaterial zurückzugewinnen.
Säulenfüllung:	Man versetzt 10 g Sephadex LH 20 mit der 4 fachen Menge des Fließmittels, läßt 24 Std. vorquellen und entgast die Aufschlämmung im Wasserstrahlpumpenvakuum. Die Säule wird mit etwas Watte verschlossen, gefüllt und noch 3 Std. äquilibriert.

Die nach der Auftrennung der pH 1-Fraktion, ausgehend von 50 g Haferspelzen,gelöst in 0.5 ml Methanol, erhaltenen 10 Fraktionen,wurden gefriergetrocknet und dem biologischen Test unterworfen.

b) Auftrennung im präparativen Maßstab

Zur Auftrennung im präparativen Maßstab (Extrakt aus 600 g Haferspelzen) wurden eine Glassäule 600 x 50 mm und 50 g Sephadex LH 20 benutzt. Als Elutionsmittel

diente bidest. H_2O; die Durchflußrate betrug ca. 30 ml/h. Es wurden zwei aktive Fraktionen B und E erhalten.

1 Auftrennung des nach NH_3 - Verseifung erhaltenen Extraktes

Nach dem unter 4.3 beschriebenen Verfahren wurde auch der nach Verseifung der wässrigen Phase erhaltene Ätherextrakt aufgetrennt. Die biologische Aktivität wurde in der Fraktion A gefunden.

2 Dünnschichtchromatographie der in 5.1 erhaltenen Fraktionen

Um die Auftrennung an Kieselgel mit der an Sephadex korrelieren zu können, wurden die von der Sephadex - - Säule eluierten Fraktionen auf einer HPTLC - Si 60 - - Fertigplatte (Fa. Merck) dünnschichtchromatographisch getrennt. Als Fließmittel diente das Gemisch Benzol/Methanol/Eisessig = 40/5/2, das auch bei der Säulenchromatographie an Kieselgel verwandt wurde (s. unter 4.1).

Chromatographie der in 4.3 und 5.1 erhaltenen aktiven Fraktionen A, B und E

1 Rechromatographie an Sephadex LH 20

Säule: Glassäule 100 x 0.5 cm
Füllhöhe: 90 cm
Säulenmaterial: Sephadex LH 20
Elutionsmittel: H_2O bidest.
Detektion: Messung der Absorption bei 280 nm
(Geräte s. unter 4.2)

Aufgetragen wurden je 0.5 ml einer methanolischen Lösung von: a) Fraktion A (NH_3 - Verseifung) der Chromatographie an Sephadex LH 20

b) Fraktionen B und E (pH 1-Fraktion) der Auftrennung an Sephadex LH 20

6.2 Gelfiltration an Biogel P 2

Säule:	100 x 1 cm (mit Kühlmantel)
Gelbetthöhe:	100 cm
Säulenmaterial:	Biogel P 2
Elutionsmittel:	H_2O bidest.
Durchflußgeschwindigkeit:	1 ml/h
Detektion:	Messung der Absorption bei 254 nm

Die Auftragsmenge beträgt 0.3 ml einer methanolischen Lösung der Fraktion A nach Chromatographie an Sephadex.

6.3 Chromatographie an Lichroprep Si 60

Säule:	Glassäule 50 x 2.5 cm
Füllhöhe:	30 cm
Säulenmaterial:	Lichroprep Si 60 (15-25 µm) der Fa. Merck
Elutionsmittel:	a) Chloroform b) Methylenchlorid/Methanol = 10/1; das Lichroprep wird mit 2 % H_2O desaktiviert c) Methylenchlorid/Methanol = 10/1; keine Desaktivierung des Adsorbens
Detektion:	a) Aufnahme der UV - Spektren von 200 - 300 nm der einzelnen Fraktionen b) Dünnschichtchromatographisch auf HPTLC - Si 60 - Fertigplatten in dem Fließmittelsystem CH_2Cl_2/Methanol = 10/1 Ansprühreagenz: Vanillin/H_2SO_4 (Stahl Nr. 247)

7. Methylierung der aktiven Fraktionen

7.1 Methylierung mit Diazomethan

In einem 50 ml Dreihalskolben mit Tropftrichter, Vorstoß und absteigendem Kühler gibt man eine Lösung von 3 g KOH in 5 ml dest. Wasser, 17 ml " Carbitol " (Diäthylenglykolmonoäthyläther) und 5 ml Äther. Man erhitzt diese Mischung im Wasserbad auf 70 - 75 °C. Sobald der Äther zu sieden beginnt, tropft man eine Lösung von 10 g N-Methyl--N-Nitroso-p-Toluolsulfonamid in ca. 80 ml Äther innerhalb 1/4 Std. zu. Während der Destillation muß die Mischung im Destillationskolben gerührt und die Vorlage gut gekühlt werden.

Die zu methylierende Fraktion wird gefriergetrocknet und portionsweise mit der ätherischen Diazomethanlösung versetzt, bis die Stickstoffentwicklung nachläßt und die gelbe Farbe des Diazomethans erhalten bleibt. Um eine vollständige Umsetzung zu erzielen, läßt man noch ca. 12 Std. im Kühlschrank reagieren und setzt nach vorzeitigem Verschwinden der Gelbfärbung noch Diazomethan zu.

7.2 Methylierung mit Dimethylsulfat

In einen 25 ml - Dreihalskolben mit Rückflußkühler und Tropftrichter gibt man 0.5 g Na und läßt unter Rühren 5 ml absoluten Äthanol zutropfen. Das Reaktionsgemisch wird bis zum vollständigen Auflösen des Natriums weitergerührt; verläuft die Reaktion zu heftig, muß notfalls gekühlt werden.

Die zu methylierenden Substanzen werden in 3 ml abs. Äthanol gelöst; man fügt 5 ml des Alkoholates hinzu, läßt 1 ml Dimethylsulfat unter Rühren zutropfen und kocht 60 Min. am Rückfluß. Nach dem Abkühlen wird so viel Eiswasser zugegeben, daß sich das ausgefallene Salz gerade löst. Die wässrige Phase schüttelt man 1 x mit 50 ml, 2 x mit je 25 ml Äther aus, wäscht die Ätherphase mit Wasser, trocknet über Na_2SO_4 und zieht den Äther am Rotationsverdampfer ab. Der Rückstand wird dünnschichtchromatographisch und im Biotest untersucht.

8. Sublimation

Um die Methylester von schwerer flüchtigen Verbindungen abzutrennen, wurden die methylierten Fraktionen sublimiert. Dazu wird die ätherische Lösung, die die Methylester und noch einen Überschuß an Diazomethan enthält, von dem nicht umgesetzten Rückstand abdekantiert, in eine Sublimationsapparatur überführt und der Äther und das Diazomethan mit einem schwachen Stickstoffstrom abgeblasen. Die Sublimation erfolgt 1 Std. bei 120 °C (Ölbadtemp.) im Ölpumpenvakuum (ca. 0.2 Torr). Das Sublimat wird mit Äther vom Sublimationsfinger gelöst, der nicht sublimierbare Rückstand mit Methanol aus der Vorlage gelöst und verworfen.

9. Trimethylsilylierung

Der Nachweis von OH - Gruppen erfolgte durch Trimethylsilylierung der jeweiligen Probe und anschließender GC/MS - Trennung. Zur Derivatisierung wird die Probe in 10 Teilen Pyridin gelöst, mit 2 Teilen Hexamethyldisilazan

und einem Teil Trimethylchlorsilan versetzt und 30 Min. auf 80 °C erwärmt. Danach werden das überschüssige Silylierungsreagenz und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

10.1 Chromatographie der durch Sublimation gereinigten Methylester

Sie erfolgte säulenchromatographisch an Lichroprep Si 60 (15 - 25 µm, Fa. Merck).

Verwendet werden Glassäulen, deren Länge und Durchmesser je nach Auftragsmenge variiert (Länge: 40 - 5 cm; Durchmesser: 2.5 - 1 cm). Eine Aufschlämmung von Lichroprep in Hexan im Verhältnis 1:4 wird in die Säule eingefüllt und diese 2 Stunden mit Hexan äquilibriert.

Die ätherische Sublimatlösung wird unter einem schwachen Stickstoffstrom eingeengt und in wenig Hexan/Essigester = 1/1 aufgenommen. Als Elutionsmittel dient Hexan, dem in steigender Konzentration Essigester zugesetzt wird; entweder mit Hilfe eines Gradientenmischers, dessen Vorratsgefäße aus Glas bestehen müssen, oder manuell, indem man die verschiedenen Fließmittelgemische, beginnend mit 5 % Essigester bis zu einer Endkonzentration von 50 % Essigester nacheinander auf die Säule aufträgt. Das Eluat wird in Portionen von 0.5 ml fraktioniert.

Die Detektion erfolgt durch Kombination von Gaschromatographie und biologischem Test.

Untersuchungen über die Löslichkeit der hemmenden Substanzen ergaben, daß der Hemmstoff RT 29.5 (s. unter 5) sich in reinem Hexan löst, während weitere Hemm fraktionen

erst nach dem Lösen des Methylestergemisches in Hexan/ EE = 1/1 isoliert werden. Bei der gezielten Anreicherung des Hemmstoffs RT 29.5 wurde das Sublimat, quasi als Vorreinigung, mit Hexan versetzt und nur die löslichen Verbindungen an Lichroprep aufgetrennt.

10.2 Präparative Gaschromatographie der pH 1 - Fraktion von Avena fatua

Die unter 10.1 beschriebene Methode, um die Methylester aufzutrennen, konnte bei der pH 1-Fraktion von Avena sativa und A. fatua nicht angewandt werden, ebensowenig bei der nach Behandlung mit Ammoniak aus Avena fatua (s. 3.4.3) erhaltenen Fraktion. Die für die Hemmwirkung verantwortlichen Substanzen werden entweder auf der Lichroprep - Säule verseift und die freien Säuren irreversibel am Kieselgel adsorbiert (die saure Verseifung erfolgt sehr leicht bei β-Hydroxy und β-Ketocarbonsäureestern), oder es laufen Oxidationen, z.B. an Doppelbindungen, bzw. säurekatalysierte Umlagerungen ab.

Die Auftrennung der gereinigten pH 1-Fraktion von Avena fatua erfolgte durch präparative Gaschromatographie. (Die Arbeiten wurden am Institut für Lebens - mitteltechnologie in Freising - Weihenstephan ausgeführt

Gerät:	präp. Gaschromatograph Varian 1800
Säule:	gepackte Stahlsäule, Länge 5 m
	5 % FFAP auf Varaport 30 (80/100 mesh
Detektor:	FID
Temperaturprogramm:	150 - 240 °C/ 4 °C/ min.
Einspritzmenge:	jeweils 4.5 µl

Die eingespritzte Substanz wurde gesplittet, 9 Teile wurden dem Ausgang, 1 Teil dem Detektor zugeführt. Die nach steigendem Molekulargewicht und unterschiedlicher Polarität aufgetrennten, gasförmig austretenden Substanzen ließen sich am Säulenausgang an Tenaxröhrchen kondensieren und adsorbieren. Hierzu wurden dünne Glaskapillaren mit Tenax GC (2,6-Diphenyl--p-Senyloxid, poröses Polymer, Fa. WGA) gefüllt, an beiden Seiten mit Glaswolle verschlossen, mit dem Säulenende verbunden und über Aluminiumfolie mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Äther vom Tenax eluiert und im Biotest untersucht.

11. Allgemeines Aufarbeitungsschema

Avena sativa: 120 g Spelzen/1 l bidest. H_2O

Avena fatua: 120 g Spelzen + Körner;
84 g Spelzen/1 l bidest. H_2O

12 h Extraktion bei 100 °C

Rohextrakt (dessen Volumen dient als Bezugsbasis für die Biotests)

1. mit $NaHCO_3$ auf pH 7 (wurde nicht weiter aufgearbeitet)

2. mit konz. H_2SO_4 auf pH 1 Ätherextrakt

3. wässrige Phase mit NH_3 20 h bei pH 11 verseifen und mit H_2SO_4 auf pH 1 bringen und mit Äther extrahieren

Chromatographie an Sephadex LH 20

Avena sativa: aktive Fraktionen A und B

Avena fatua: aktive Fraktionen A_f und B_f

Methylierung mit Diazomethan

Sublimation der Methylester

B und A_f nicht weiter aufgearbeitet

A: Chromatographie des Sublimats an Lichroprep

B_f: Präparative Gaschromatographie des Sublimats

danach jeweils GC und Biotest der Fraktionen

12. Vor - und Nachteile verschiedener Biotests

Eine gesicherte Aussage über das Vorhandensein eines Keimungsinhibitors in einem Pflanzenextrakt oder einer nach Chromatographie erhaltenen Fraktion, über seine Wirksamkeit und die vorliegende Konzentration läßt sich nur mit Hilfe eines biologischen Tests machen. Da es sich bei den zu isolierenden Naturstoffen in vielen Fällen um unbekannte Verbindungen handelt, kann auch nicht auf chemische Nachweisverfahren zurückgegriffen werden; es besteht die Gefahr, daß lediglich inaktive Verunreinigungen, nicht aber die gesuchten Substanzen selbst sichtbar gemacht werden.
Als gebräuchlichstes Kriterium für die Keimung dient die Wurzelbildung bzw. die Länge der Keimwurzel [31) Ketring, 1973; 25) Evenari, 1949]. Ferner wird zur Feststellung allgemein retardierender Effekte häufig ein standardisierter Weizenkeimlingstest, zur Ermittlung Gibberellin - antagonistischer Eigenschaften ein Zwergerbsentest verwandt [39) Schreiber, 1976]. Zum Nachweis von Indolessigsäure - Antagonisten eignet sich der Avena - Koleptilzylindertest. In jüngster Zeit versucht man vermehrt, spezifischere Nachweismethoden, z.B. durch den Einsatz von Zellkulturen oder speziellen Membranfraktionen [66) Hertel, 1977 - Auxinbindungstest] zu finden.

12.1 Biotest mit Avena sativa

Pflanzenmaterial: entspelzte Körner von Avena sativa L., Sorte " Husar "

Testbehälter: Plastikpetrischalen (9 cm Durchmesser), mit 2 Lagen Filterpapier (Schleicher und Schüll, Nr. 595)

Testvolumen: 6 ml

Während der Versuche, die pH 1-Fraktion an Kieselgel bzw. mit Hilfe der HPLC aufzutrennen sowie bei den Untersuchungen zur " gebundenen " Form des Hemmstoffs diente die Keimungshemmung bei Avena sativa als Kriterium für die Effektivität der durchgeführten Schritte. Dieser von R. Karl ausgearbeitete Biotest [62)] basiert auf der Überlegung, daß der in den Haferspelzen nachzuweisende Hemmstoff seine Wirkung primär gegenüber den Samen der eigenen Spezies entfalten sollte. Als Maß für die Keimungshemmung dient die Länge von Keimwurzel und Koleoptile nach 48 Stunden Keimdauer bei 27 °C im Vergleich zur Wasserkontrolle. Auf Grund der kurzen Keimdauer des Testsaatgutes führt der Biotest relativ rasch zu den für nachfolgende Arbeisschritte erforderlichen Aussagen. Um die Karyopsen als Testmaterial einsetzen zu können, werden sie per Hand entspelzt und Exemplare, die dunkle Flecken oder einen beschädigten Embryo aufweisen, ausgesucht. Damit einheitliche Bedingungen während der Keimung gewährleistet sind, werden die Karyopsen gleichmäßig in die mit 2 Lagen Filterpapier und 6 ml der zu testenden Lösung beschickten Petrischalen verteilt. Die Vorbereitungen und die Aussaat erfordern einen hohen Zeitaufwand.

Bei fortschreitender Auftrennung der Ätherphase nach Ammoniakverseifung und der pH 1-Fraktion an Sephadex und anschließend an Lichroprep mußten bis zu 40 Fraktionen auf ihre Hemmwirkung überprüft werden. Biotests in dem Ausmaß lassen sich mit Avena sativa als Testsaatgut auf Grund der hohen Arbeitsintensität nicht mehr ausführen.

Ein weiterer Nachteil liegt in dem erforderlichen Testvolumen von 6 ml. Eines der Ziele dieser Arbeit war es, eine ausreichende Menge an Reinsubstanz zu isolieren, um die Struktur der Keimungsinhibitoren mit Hilfe spektroskopischer Methoden aufzuklären. Jeder Reinigungsschritt schließt aber schon einen gewissen Substanzverlust ein. Da die zu isolierenden Hemmstoffe in sehr geringen Konzentrationen (50 - 100 ng/g Saathaferspelzen) in den Haferspelzen vorliegen, sollte die im Biotest einzusetzende Hemmstoffmenge möglichst gering gehalten werden; d.h. man muß Testsaatgut wählen, das eine höhere Empfindlichkeit gegenüber den Inhibitoren aufweist.

12.2 Avenakoleoptilzylindertest

Zum Nachweis von Auxinen und deren Antagonisten dient der Avenakoleoptilzylindertest [98),99) Boyarkin, 1947, 1948]. Auch Weizenkoleoptilen finden Verwendung.

Von drei Tage alten, etiolierten Weizenkeimlingen wird 5 mm der Spitze entfernt und ein Koleptilzylinder von 10 mm Länge herauspräpariert. 10 dieser Zylinder werden 17 - 20 Stunden mit einer Lösung inkubiert, die sich aus 5 ml 1 x 10^{-5} M - IAA- und 5 ml Testlösung zusammensetzt.

Als Maß für die durch den IAA - Antagonisten hervorgerufene Wachstumshemmung dient die Längenzunahme der Koleoptilzylinder in der Testlösung im Vergleich zu einer Blindprobe, die nur 10 ml IAA - Lösung enthält. Nach Untersuchungen von Ballin [97) 1967] erfolgt das Wachstum der Koleoptilzylinder in Gegenwart von IAA während der ersten 8 Stunden linear, um dann einen Sättigungswert zu erreichen. Die Inkubationszeit läßt sich daher auf 6 - 8 Stunden verkürzen. Der Biotest mit Weizenkoleoptilen liefert Informationen über den Wirkungsmechanismus eines Inhibitors und führt nach kurzer Zeit zu Aussagen. Während der Vorversuche, die nach Chromatographie der NH_3 - Verseifung an Sephadex LH 20 isolierte aktive Fraktion weiter aufzutrennen, wurden parallel 2 Proben im Weizenkoleoptiltest auf Bioaktivität geprüft:

Probe 1: Fraktion A nach Rechromatographie an Sephadex LH 20

Probe 2: Fraktion A nach Überführen der Säuren in Ammoniumsalze und anschließender Ätherextraktion bei pH 1 (der pH wurde mit konz. H_2SO_4 eingestellt)

Obwohl die Probe 1 das Wachstum der Weizenkoleoptilzylinder nicht beeinflußte, wurde deren Wachstum durch Probe 2 völlig gehemmt; teilweise waren diese bis zu 0.8 mm kürzer als zu Beginn der Inkubation. Diese Verkürzung kann nur durch Wasserverlust erklärt werden. Die nicht weiter aufgereinigten Rohextrakte (inklusive pH 1-Fraktion und saurem Ätherextrakt nach NH_3-Verseifung)

bewirkten neben einer Wachstumshemmung eine Deformierung (starke Krümmung) und dunkle Verfärbung der Zylinder, die vor allem an den Enden zu beobachten war. Nach Einwirkung der Probe 2 blieben die Koleoptilzylinder gestreckt und behielten ihre ursprünglich weiße Farbe, sodaß die Wachstumshemmung auf Grund eines Artefaktes nicht ausgeschlossen werden konnte.

Die in Äther vorliegende Probe 2 (abzüglich der im Biotest eingesetzten 3 ml; Probe 1 und 2 wurden aus 85 g Haferspelzen gewonnen) wurde zur Trockne eingeengt und der pH - Wert in 10 ml H_2O gemessen. Die Lösung zeigte einen pH von 2, die Prüfung auf SO_4^{2-} war positiv, d.h. die Probe enthielt noch Spuren von H_2SO_4, auf die die Wachstumshemmung zurückgeführt werden könnte.

Tab.1: Die Abhängigkeit des Wachstums der Weizenkoleoptilzylinder von niedrigen pH - Werten in Gegenwart von 1×10^{-5} M - IAA (≙ 100 % Wachstum)

Probe	Längenzunahme [mm]	% Wachstum	% Hemmung
$1x10^{-5}$ IAA	7.77	100	-
pH 2	-0.69	-8	108
pH 3	1.65	21.2	78.8
pH 4.4	7.56	97.3	2.7
pH 5	7.73	99.5	0.5
pH 6	7.71	99.2	0.8

Um die Abhängigkeit des Wachstums der Koleoptilzylinder vom pH - Wert zu bestimmen, wurden jeweils 10 Zylinder in bidest. H_2O mit steigenden pH - Werten von 2 bis 6 inkubiert (s. Tab.1).

Das durch Indolessigsäure induzierte Wachstum der Weizenkoleoptilzylinder wird durch wässrige Lösungen mit pH - Werten kleiner 3 völlig, mit einem pH - Wert von 3 zu 79 % gehemmt. Ab pH 4.5 ist kein Einfluß des pH - Wertes mehr festzustellen. Eine durch Extraktion von 120 g Haferspelzen und anschließender Ätherextraktion bei pH 1 erhaltene keimungshemmende Fraktion weist, in H_2O gelöst, einen pH von 2.8 auf. Die nach Verseifung mit Ammoniak mit Äther extrahierbaren sauren Substanzen besitzen in wässriger Lösung ebenfalls einen pH von 2.8. Der pH - Wert der biologisch aktiven Fraktionen nach Auftrennung an Sephadex LH 20 beträgt 3.0, obwohl, bedingt durch die Aufarbeitung, noch vorhandene H_2SO_4 - - Spuren durch die Chromatographie eliminiert werden.

Auf Grund der niedrigen pH - Werte der zu untersuchenden Proben kann eine Wachstumshemmung erfolgen, die das Vorliegen eines IAA - Antagonisten vortäuscht.

Um diese Fehlerquelle auszuschalten, wurde das Medium mit einem K_2HPO_4/ Citratpuffer, der in einem pH - Bereich von 2.5 bis 8 wirksam ist, abgepuffert. In dem abgepufferten System ist die keimungshemmende Wirkung der pH 1-Fraktion, des Ätherextraktes nach Ammoniakverseifung und der aktiven Fraktionen A und B, erhalten nach Chromatographie an Sephadex, vermindert.

Als Beispiel sei hier die Untersuchung der Wachstumshemmung der pH 1-Fraktion im Weizenkoleoptilzylindertest angeführt:

a) Gemessene Wachstumshemmung in bidest H_2O: 83 %

b) Wachstumshemmung in K_2HPO_4/ Citratpuffer: 37 % .

Der Weizenkoleoptilzylindertest schien auf Grund der hier aufgeführten Beobachtungen für den routinemäßigen Einsatz wenig geeignet.

12.3 Amaranthuskeimtest

Pflanzenmaterial: Amaranthus caudatus (Fuchsschwanz)

Testbehälter: Glaspetrischalen (Durchm. 4.5 cm) mit einer Lage Filterpapier (s. 12.1)

Testvolumen: 1 ml

Die Samen von Amaranthus caudatus zeichnen sich durch ihre geringe Größe und ihre im Vergleich zu den Samen von Avena sativa zehnfach höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Hemmstoff aus. Im Biotest mit Amaranthus wird daher nur ein Testvolumen von 1 ml benötigt. Die Keimung erfolgt unabhängig vom pH - Wert (in einem pH- - Bereich von 2 - 10). Die Samen weisen eine Keimrate von 90 % auf und können ohne Vorbehandlung eingesetzt werden; der Amaranthustest ist daher erheblich schneller durchzuführen als der Biotest mit Avena sativa. Die Keimdauer beträgt 48 Stunden. Als Maß für die Hemmung dient, je nach Wirkungsweise des untersuchten Inhibitors, neben der Länge der Keimwurzel auch die Keimrate. Da der Amaranthuskeimtest den meisten Anforderungen gerecht wird, fand er bevorzugt bei der Auftrennung der pH 1 - Fraktion und des Ätherextraktes nach Ammoniakverseifung zum Nachweis von Keimungsinhibitoren Verwendung.

12.4 Biotest mit der Zellkultur AN 1175 (Pimpinella anisum)

4 Parallelproben folgender Zusammensetzung werden angesetzt: 49 ml Nährmedium, in dem die Zellkultur (5 ml) suspendiert wird; das Nährmedium enthält 2.4 - D in einer Konzentration von 2.2 mMol; sowie 1 ml der zu testenden Lösung. Die Proben werden auf 4 Kolben verteilt, bei 27°C mit einer Lampe bestrahlt (ca. 1500 lux, spez. Rotlichtanteil) und zur guten Durchmischung des Mediums geschüttelt. Als Maß für die Hemmwirkung dient die Zellzahl der Kultur in verschiedenen Stadien des Wachstums im Vergleich zu einer Blindprobe. Die erste Zellzählung erfolgt nach 3 Tagen, (Ende der lag - Phase), die 2. nach 7 Tagen (Mitte der log - Phase), die 3. nach 10 Tagen (Beginn der stationären Phase) und die 4. nach 13 Tagen (stationäre Phase). Dieser Test wurde nur zur Untersuchung des Wirkungsspektrums der Fraktion A eingesetzt und wird hier daher nur kurz erwähnt.

B. Analytischer Teil

1. Dünnschichtchromatograghie (DC)

Die vergleichenden Untersuchungen an den aktiven Fraktionen sowie die Identifizierung der einzelnen Fraktionen der präparativen Kieselgelsäule wurden teilweise dünnschichtchromatographisch durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte im allgemeinen auf HPTLC-Si - 60 Fertigplatten (Fa. Merck, Darmstadt).

Tab. 2: Fließmittelsysteme

Benzol/Methanol/Eisessig = 40/5/2

Äthylacetat/Isopropanol = 65/24

Methylenchlorid/Methanol/Wasser = 40/20/1

Methylenchlorid/Methanol = 10/1

Hexan/Äthylacetat = 1/1

Hexan/Äthylacetat/Äthanol = 15/15/2

Hexan/Äthylacetat/Aceton = 15/15/2

Tab. 3: Ansprühreagenzien

Anisaldehyd/H_2SO_4 (Stahl Nr. 15)

Hydroxylamin/$FeCl_3$ (Stahl Nr. 122)

Dinitrophenylhydrazin/$K_3[Fe(CN)_6]$ (Stahl Nr. 76)

Kaliumpermanganat/H_2SO_4 (Stahl Nr. 145)

Vanillin/H_2SO_4 (Stahl Nr. 247)

!,3-Dihydroxynaphthalin/H_2SO_4 (Reagenz auf Äpfelsäure)

Nach dem Ansprühen wird jeweils 15 Min. bei 120 °C im Trockenschrank entwickelt.

2. Infrarotspektroskopie

Die IR - Spektren wurden mit dem IR - Gerät IR 9 (Beckman, München) angefertigt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei Festsubstanzen in KBr - Preßlingen, die Flüssigkeiten wurden zwischen Kochsalzplatten gepreßt (Angabe der Daten in $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]).

3. Gaschromatographie

Die weiteren Reinigungs- und Trennschritte der nach Methylierung und Sublimation gewonnenen, flüchtigen, nur in geringen Konzentrationen vorliegenden Carbonsäureester wurden mit Hilfe der Gaschromatographie verfolgt. Die quantitative Bestimmung des Hemmstoffs, bei der Äpfelsäure als Standard diente, wurde ebenfalls gaschromatographisch ausgeführt.

Geräte: Carlo Erba Mod. 2300
Carlo Erba Mod. 2101 AC

Säulen: Glaskapillarsäule OV 1 (Länge 20 + 25 m)
Glaskapillarsäule SP 1000 (belegt mit FFAP, Länge 20 m)

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID)

Trägergas: Helium (flowrate: 2 cm^3 min^{-2})

Injektortemperatur: 225 °C

Injektion: splitlos, auf die kalte Säule bei ca. 6 bar

Temperaturprogramm: 60 °C - 240 °C, 3 °C/min.

4. Gaschromatographie - Massenspektrometrie (GC - MS)

Für die gaschromatographische Auftrennung wurden die gleichen Bedingungen wie unter 3. gewählt, um vergleichbare Retentionszeiten zu erhalten.

Gaschromatograph: Carlo Erba 2101 AC

Massenspektrometer: Varian GH 7 A

Ionisierungsenergie der Elektronen: 70 eV

4 Minuten nach erfolgter Injektion wurden die nacheinander im MS eintreffenden Substanzen gescant.

Für die vergleichenden Untersuchungen im GC und für die Aufnahme der Massenspektren wurden die Säuren mit Diazomethan methyliert. Die ungesättigten Säuren, v.a. Fumarsäure, ergeben, neben den Methylestern, durch Anlagerung des Diazomethans an die Doppelbindung Pyrazolderivate [67) Mc Keown, 1965]. Eine einheitliche Produkte liefernde Veresterung (bzw. Umesterung) von Maleinsäureanhydrid, Fumarsäure, Itaconsäure, Bernsteinsäureanhydrid und Äthylmalonsäure wurde mit folgender Methode erzielt: Die jeweilige Säure (bzw. der Äthylester) wird in 10 ml Methanol gelöst und mit einem Tropfen konz. H_2SO_4 versetzt. Nach 48 Stunden Stehen bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Umschütteln wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer weitgehend abgezogen, der Rückstand in Äther aufgenommen und die Schwefelsäure durch mehrmaliges Waschen mit H_2O entfernt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird die ätherische Lösung am Rotationsverdampfer eingeengt.

Tab. 4: Vergleichssubstanzen für GC - MS

Abscisinsäure (Fa. Merck)

trans - Aconitsäure (Fa. Sigma)

L - Äpfelsäure (Fa. Sigma)

Äthylmalonsäure

Brenztraubensäurediäthylester (Fa. Merck)

Citronensäure (Fa. Merck)

Dehydrophaseinsäure (Werte aus Lit.)

4' - Dehydrophaseinsäure (Werte aus Lit.)

4' - Desoxyabscisinsäure (Werte aus Lit.)

Fumarsäure (Fa. Sigma)

Fumarsäuredimethylester (Fa. Merck)

α - Hydroxyisobuttersäure (Fa. Merck)

Itaconsäureanhydrid (Fa. Fluka)

α - Ketoglutarsäure (Fa. Sigma)

Linolsäuremethylester

Maleinsäureanhydrid

Maleinsäurediäthylester (Fa. Merck)

Malonsäure (Fa. Merck)

α-Methyl-β-Carbäthoxy-Bernsteinsäurediäthylester

Methylmalonsäurediäthylester

Nonansäure (Pelargonsäure)

Ölsäuremethylester

Oxalessigsäurediäthylester

Phaseinsäure (Werte aus Lit.)

Literaturwerte wurden entnommen aus [131) Tietz, 1979]

5.1 MS mit Direkteinlaßsystem

Von hinreichend gereinigten Fraktionen und synthetischen Vergleichssubstanzen (s. Tab.4) wurden die Massenspektren mit einem doppelfokussierenden JMS - D 100 - - Spektrometer (Jeol, Tokyo) mit Direkteinlaßsystem und Elektronenstoßionisation (Ionisierungsenergie : 75 eV) aufgenommen. Um ein genaues Auszählen der Massen zu ermöglichen (Verschiebung auf Grund von Fehlstellen um 1 - 2 Masseneinheiten), wurden zu jeder Messung Eichspektren mit PFK (Perfluorkerosin, hochsiedend) aufgenommen.

5.2 Hochauflösende Massenspektrometrie

Zur Ermittlung des genauen Molekulargewichts und zur Bestätigung der angenommenen Elementarzusammensetzung wurde von dem Hemmstoff aus der NH_3 - Verseifung ein hochauflösendes Massenspektrum aufgenommen.

Gerät: ZAB Vakuumgenerator; Säule: SE 30, 20 m

Temperaturprogramm: 40 - 60 °C/ 39.9 °C/min

60 - 250 °C/ 3 °C/min

Injektortemperatur: 230 °C

Beschleunigungsspannung: 7 kV

Quellentemperatur: 180 °C

Mode: E I; Anodenstrom: 200 µA

Multiplier: 2.1 kV; Amplifier: 1×10^{-6}

Scangeschwindigkeit: 3 s/mass decade

Computer: VG Multispec

Massrange: 25 - 400 ME

Weitere Bedingungen s. III.B.3 und 4, S. 41

6. Vergleich der biologisch aktiven Fraktionen mit bereits beschriebenen Keimungsinhibitoren

6.1 Isolierung von DMBOA und MBOA aus Zea mays L.

Die Isolierung von Dimethoxybenzoxazolinon (DMBOA) und Methoxybenzoxazolinon (MBOA) aus den Koleoptilen von Zea mays erfolgte nach der Vorschrift von Venis und Watson [90) 1978]. Die Ansaat des Mais ist unter 1. beschrieben. 100 g Koleoptilen und Primärblätter von 5 Tage alten Maiskeimlingen werden bei Raumtemperatur mit 100 ml bidest. H_2O homogenisiert, das Homogenat auf 1.5 l verdünnt und 30 Minuten bei Raumtemperatur extrahiert. Man erhitzt die Mischung 1 Std. im Wasserbad bei 100 °C, läßt auf Raumtemperatur abkühlen und filtriert durch 2 Lagen Miracloth. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer auf ca. 350 ml eingeengt und mit Methylenchlorid extrahiert. Man destilliert das Lösungsmittel bis zur Trockne i. Vak. ab, nimmt den Rückstand in 50 ml Essigsäureäthylester auf und schüttelt 3 mal mit je 50 ml 0.5 M Na_2CO_3 - Lösung aus. Der alkalische Extrakt wird auf pH 5.5 eingestellt und mit Methylenchlorid extrahiert. Nach dem Trocknen über $NaSO_4$ wird der Rückstand in 7 ml Chloroform aufgenommen und an einer Kieselgel Si 60 - Säule nach Äquilibrierung mit 100 ml Chloroform aufgetrennt.

Säule: Glassäule 8 x 1 cm

Fließmittel: Chloroform/Methanol/H_2O - Gemisch steigender Polarität

Die aktiven Fraktionen werden mit Chloroform vom Kieselgel eluiert und durch fraktionierte Kristallisation

aus Chloroform/ Methanol = 2/1 gereinigt.
Die drei ersten Fraktionen wurden auf Grund ihrer Farbreaktion mit $FeCl_3$, ihrer Absorption im UV, ihrer hemmenden Wirkung im Weizenkoleoptilzylindertest und durch Vergleich mit dem authentischen Benzoxazolinon (Fa. Merck) als BOA, MBOA und DMBOA identifiziert.

6.2 Versuche zum Nachweis von DMBOA, MBOA und BOA in den Spelzen von Avena sativa

Nach der oben beschriebenen Methode wurden ebenfalls 45 g Haferspelzen aufgearbeitet und die nach Trennung an Kieselgel erhaltenen Fraktionen dünnschichtchromatographisch mit den aus Mais isolierten Benzoxazolinonen verglichen. Als weiterer Identitätsnachweis diente der Weizenkoleoptilzylindertest.

IV. ERGEBNISSE

1. Präparative Auftrennung der pH 1 - Fraktion

Nach den Untersuchungen von Karl [62)] lassen sich die durch Kochen im wässrigen Medium aus Haferspelzen extrahierbaren Keimungsinhibitoren durch Ätherextraktion im Sauren anreichern. Ätherextrakte bei neutralen und basischen pH - Werten zeigten im ersten Fall keine, im zweiten nur 40 % der durch den sauren Ätherauszug (er wird im folgenden als pH 1-Fraktion bezeichnet) hervorgerufenen Keimungshemmung.

Die pH 1-Fraktion enthielt ein komplexes Gemisch verschiedener Phenolcarbonsäuren, die durch längeres Kochen mit Wasser oder Säure zusammen mit Luftsauerstoff zu höhermolekularen Verbindungen polymerisieren können, und acyclische organische Säuren, z. B. Mono - und Dicarbonsäuren sowie Hydroxycarbonsäuren (s. unter IV.4.4).

Wie schon eingangs erwähnt, können, entgegen früheren Untersuchungen [58)-60) Börner, 1955-57; 61) Herrmann, 1958; 91) Jayachandran-Nair,1975], die in der pH 1-Fraktion nachgewiesenen Phenolcarbonsäuren in den Konzentrationen, in denen sie in den Haferspelzen vorliegen, nicht für die auftretende Keimungshemmung verantwortlich sein [62) Karl, 1979]. Sie sollten daher durch geeignete chromatographische Methoden von den übrigen Substanzen abgetrennt werden, um so den Kreis der für die Keimungshemmung verantwortlichen Verbindungen weiter eingrenzen zu können.

1.1 Säulenchromatographie an Kieselgel

Die mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie durchgeführten Vorversuche zeigten, daß die Phenolcarbonsäuren an Kieselgel mit dem Fließmittelsystem: Benzol/Methanol/Eisessig = 40/5/2 nach der steigenden Anzahl der OH - Gruppen aufgetrennt werden. Verbindungen mit 2 OH - Gruppen zeigen kleinere R_f - Werte als die mit nur einer; Methoxygruppen bewirken einen gegenteiligen Effekt. Dieses System wurde auf die präparative Trennung übertragen. Die anfänglich verwandte Dickschichtchromatographie erwies sich wegen der geringen Belastbarkeit der Platten als wenig effektiv. Daher wurde die Auftrennung der pH 1-Fraktion säulenchromatographisch an Lichroprep Si 60 durchgeführt. Mit Hilfe des Keimungstests (mit Avena sativa) wurde eine aktive Fraktion lokalisiert, die ca. 7 Gew.% der pH 1-Fraktion ausmacht und hier als Nebenfraktion bezeichnet wird. Die Nebenfraktion zeigt nach Chromatographie an HPTLC - Fertigplatten in dem oben genannten Fließmittelsystem einen R_f - Wert von 0.4 und wurde von einer Hauptkomponente , die einen R_f - Wert von 0.28 besitzt, abgetrennt. Die Hauptfraktion wurde auf Grund ihrer Farbreaktion und durch Vergleich mit dem authentischen Material als p-Cumarsäure identifiziert. Die Nebenfraktion läßt sich mit Anisaldehyd/H_2SO_4 blau anfärben. Diese Farbreaktion wurde auch nach Ansprühen von Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure und Ferulasäure mit diesem Reagenz erhalten. Einen Hinweis darauf, daß es sich bei dem Inhibitor nicht um eine

phenolische Verbindung handeln kann, lieferten die UV - - Spektren. Der Mittelwert der Absorptionsmaxima von 13 Hydroxycarbonsäuren, gemessen in Methanol, beträgt 280 nm [68) Schmidtlein, 1975]. Obwohl die Nebenfraktion 75 % der von der Hauptfraktion hervorgerufenen Hemmwirkung zeigt (s. Abb. 1, S. 50), sinkt die Extinktion bei 280 nm von 0.61 (pH 1-Fraktion) auf 0.2 (Nebenfraktion). Die biologisch nicht aktive, vor allem aus p-Cumarsäure bestehende Hauptfraktion zeigt bei 280 nm eine Extinktion von 0.54. Die späteren Versuche (s. unter IV.2.2.5) bestätigen, daß sich die Absorption bei 280 nm nicht mit der Hemmaktivität korrelieren läßt. Vermutlich handelt es sich bei der auf das Ansprühreagenz positiv reagierenden Substanz um eine Verunreinigung mit ähnlichem R_f - Wert wie der Hemmstoff. Ähnliche Beobachtungen machte Kefeli [69) 1978] bei der Isolierung von Wachstumsregulatoren aus verschiedenen Pflanzenextrakten. Die Zone des Chromatogramms mit Inhibitorwirkung lieferte eine Farbreaktion mit Reagenzien für Phenole. Durch Rechromatographie in einem anderen Fließmittelsystem ließen sich die für die Farbreaktion verantwortlichen Phenole abtrennen. Als Hemmstoff wurde Abscisinsäure, die nicht mit Indol- oder Phenolreagenzien anfärbbar ist, identifiziert. In Abb. 1 ist u.a. das Ergebnis des quantitativen Biotests der Nebenfraktion im Vergleich zur pH 1-Fraktion dargestellt. Die Nebenfraktion ruft in der 0.5 und 1 fachen Konzentration eine stärkere Hemmwirkung als die pH 1-Fraktion hervor, woraus geschlossen werden kann, daß auch ein Wuchsstoff abgetrennt wurde.

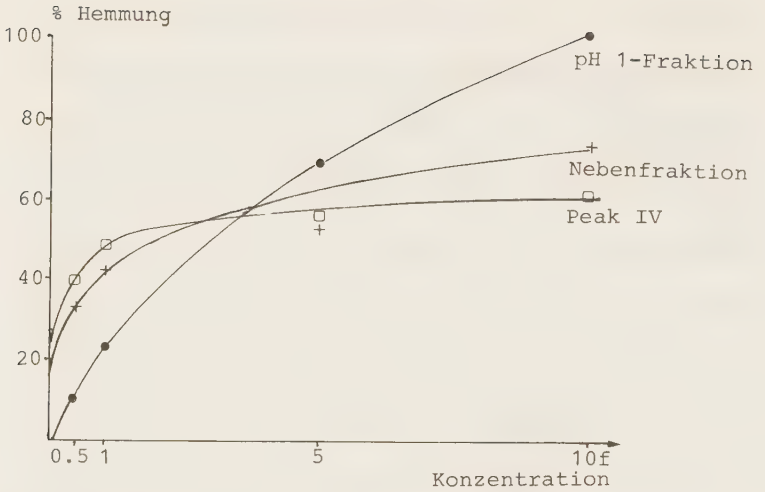


Abb.1: Hemmwirkung der pH 1-Fraktion, der Nebenfraktion und des Peak IV (nach HPLC - Trennung) bei verschiedenen Konzentrationen im Biotest mit Avena sativa

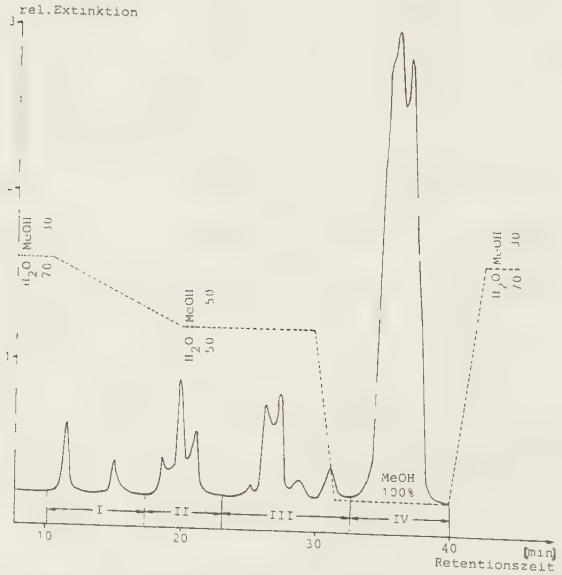


Abb.2: Elutionsdiagramm der HPLC - Trennung der nach Auftrennung einer pH 1-Fraktion an Kieselgel erhaltenen Nebenfraktion (--- Verlauf des Elutionsmittelgradienten)

1.2 HPLC - Trennung der Nebenfraktion

Die Vermutung, daß es sich bei der Nebenfraktion nicht um eine einheitliche Substanz, sondern um ein Gemisch mehrerer Verbindungen handelt, wurde durch die Auftrennung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer Reverse - Phase - Säule bestätigt. Wie aus Abb.2 zu ersehen ist, ließ sich die Nebenfraktion mit Hilfe eines Methanol/Wasser - Gradienten in mindestens 4 Fraktionen trennen. Die Hauptkomponente (Peak IV), die erst mit reinem Methanol von der Säule eluiert wurde, zeigte im Biotest mit Avena sativa eine mit der Nebenfraktion vergleichbare Hemmwirkung (s. Abb.1), während die restlichen drei Fraktionen biologisch inaktiv waren. Auf Grund des bei 280 nm detektierten Elutionsdiagramms erscheint zwar der Peak IV als Hauptkomponente, nach Auswiegen der nach Auftrennung von 20 mg Substanz erhaltenen Fraktionen entfallen auf Fraktion I und II insgesamt 7.2 mg, auf Fraktion III 6.6 mg und auf Fraktion IV lediglich 5.1 mg. Scheinbar setzen sich die ersten Fraktionen aus bei 280 nm weniger stark absorbierenden Verbindungen zusammen.

Der Peak IV besitzt 2 Maxima, daneben sind noch zwei Schultern zu erkennen. Versuche, diese Fraktion durch Rechromatographie bei gleichzeitiger Variation des Elutionsmittelgradienten weiter aufzutrennen, verliefen unbefriedigend. Das käufliche Reverse - Phase - Material ist in der Regel nicht vollständig belegt, es enthält noch polare Zentren, an denen stark polare Substanzen, um die es sich im hier beschriebenen Fall handelt,

entweder irreversibel adsorbiert werden oder nur mit ebenfalls stark polaren Elutionsmitteln, wie Methanol, abgelöst werden können. Es erwies sich als schwierig, diese polaren Zentren durch Nachbehandlung des Säulenmaterials mit den entsprechenden C_8 - oder C_{18} - Alkoholen, mit denen das Kieselgel veräthert ist, um die Phasenumkehr zu erreichen, zu eliminieren.

Die Verwendung eines Gradienten, dessen Endkonzentration an Methanol 100 % betrug, machte zwar ein längeres Spülen der Säule mit diesem Lösungsmittel nach jedem Trennungsgang weitgehend überflüssig, leider traten aber die über die Säule verschmierten Reste der Fraktionen mit kleineren Retentionszeiten in dem die aktive Substanz enthaltenden Peak IV wieder auf. Dieser trennt sich bei anschließender Chromatographie an Sephadex LH 20 nicht, wie das HPLC - Chromatogramm vermuten läßt, in zwei bzw. vier, sondern in acht Fraktionen auf.

Abb. 3 (s. S. 54) zeigt das Chromatogramm des Peaks IV nach Chromatographie an LH 20. Das erneute Auftreten von 8 Fraktionen, die alle Absorption bei 280 nm zeigen und sich noch aus mehreren Verbindungen zusammensetzen können, beweist zum einen die Komplexität des zu trennenden Gemisches,und zum anderen stellten sich die bis dahin durchgeführten Trennmethoden als wenig effektiv heraus. Die Fraktionen a - h wurden im Biotest mit Avena sativa auf Aktivität geprüft. Die Fraktion a unterdrückte die Keimung in der 10 fachen Konzentration zu 100 %, die Fraktionen b - h zeigten keine Hemmaktivität.

Nach diesem mit Sephadex erzielten Ergebnis wurde sowohl auf die Vortrennung an Kieselgel als auch auf Chromatographie mittels HPLC verzichtet. Ein Nachteil der Kieselgel - Säule lag in der langen Trennzeit. Um größere Verluste der hemmenden Fraktion zu vermeiden, war eine Trennzeit von 48 Stunden erforderlich. Bei einer höheren Durchflußgeschwindigkeit wurde die Nebenfraktion zu 30 - 40 % gemeinsam mit p-Cumarsäure eluiert. Bei längerem Kontakt von polaren Substanzen mit dem ebenfalls stark polaren, leicht sauer reagierenden Kieselgel (pH 5 in H_2O) sind, speziell in Anwesenheit von Luftsauerstoff, chemische Veränderungen der zu trennenden Substanzen wie Oxidation und Polymerisation nicht auszuschließen. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich bei der Entfernung des Elutionsmittels (Benzol, Methanol, Eisessig). Die im Gegensatz zu Benzol und Methanol schwer flüchtige Essigsäure reicherte sich nach Destillation der organischen Lösungsmittel an. Die aufgetrennten Substanzen lagen nun in einer stark sauren Lösung vor, aus der die Essigsäure nur durch Gefriertrocknung entfernt werden konnte.

Eine direkte Auftrennung der pH 1-Fraktion an Reverse - Phase - Material mittels HPLC erwies sich auf Grund der geringen Belastbarkeit der Säule für präparative Zwecke als wenig effektiv. Ein Überladen der Säule bedingte hohe Verluste an Material, da ein Teil der aufgetragenen Substanzen auf der Säulenoberfläche hängenblieb.

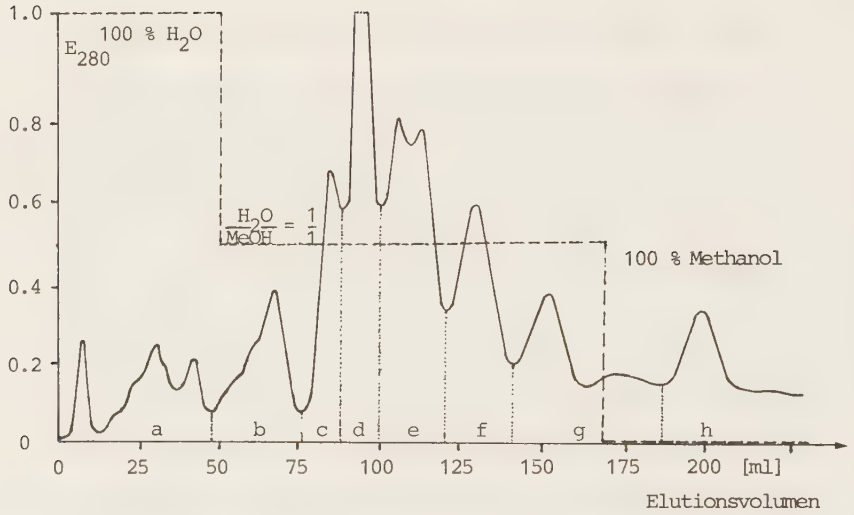


Abb.3: Elutionsdiagramm der Chromatographie einer Fraktion IV (vergl. Abb.2, S. 50) an Sephadex LH 20. Die Fraktion IV wurde durch HPLC - Trennung einer pH 1-Fraktion erhalten. (--- Stufengradient, beginnend mit 100 % H_2O über MeOH/H_2O = 1/1 bis 100 % Methanol)

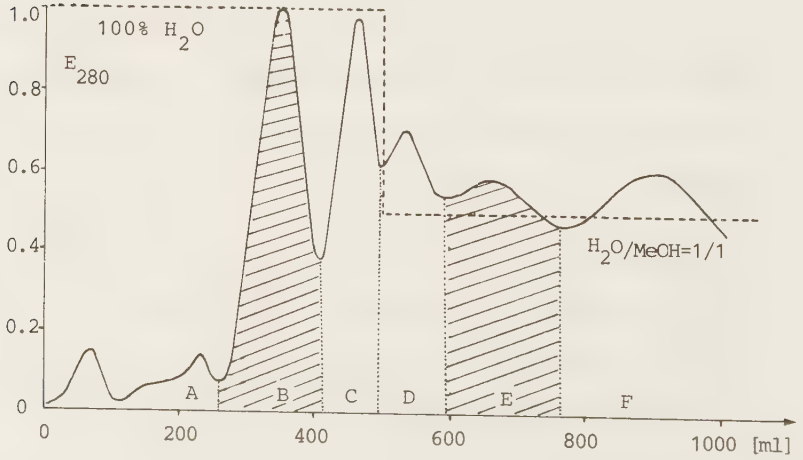


Abb.4: Auftrennung einer pH 1-Fraktion, ausgehend von 300 g Haferspelzen, an Sephadex LH 20 (--- Stufengradient, angefangen mit 100 % H_2O bis H_2O/Methanol = 1/1)

1.3 Chromatographie der pH 1 - Fraktion an Sephadex LH 20

Zu allen beschriebenen Trennmethoden wurden Vorversuche, bei denen in der Regel ein Extrakt von 25 g Haferspelzen eingesetzt wurde, durchgeführt.

Abb.4 zeigt das Elutionsdiagramm einer durch Extraktion von 600 g Haferspelzen erhaltenen pH 1-Fraktion nach Chromatographie an Sephadex LH 20. Die aufgetragene Substanzmenge, die nach Gefriertrocknung ausgewogen wurde, betrug 200 mg.

Da sich schon im Vorversuch zeigte, daß, entsprechend den Ergebnissen bei der Auftrennung des Peaks IV an Sephadex, eine der mit Wasser eluierbaren Fraktionen biologische Aktivität zeigte, ist nur der hier abgebildete Teil des Diagramms, der noch die Chromatographie mit Methanol/H_2O = 1/1 mit einschließt, für die weiteren Untersuchungen interessant.

Im Biotest, bei dem Amaranthus caudatus als Testsaatgut verwandt wurde (s. unter III.A.12.3), bewirkte die Fraktion B eine vollständige, Fraktion E eine 40 %ige Hemmwirkung. Da beide Hemmbereiche durch zwei inaktive Fraktionen getrennt sind, muß es sich bei diesen Hemmstoffen um chemisch nicht identische Verbindungen handeln. Auf die einzelnen Fraktionen entfallen folgende Substanzmengen: A: 8.8 mg

B: 63.0 mg

C: ca. 70 mg; ein genaues Auswiegen war nicht möglich, da die Verbindungen stark hygroskopisch sind.

D: 62.5 mg

E: 51.2 mg

Bei Sephadex LH 20 handelt es sich, wie schon unter II.A.4.3 erwähnt, um ein mit Propanol verähthertes, dreidimensional vernetztes Dextrangel. Die Auftrennung erfolgt teilweise nach dem Prinzip der Verteilung, teils durch Adsorption. Auf Grund der starken Wechselwirkungen zwischen der Äthergruppierung des Gels und der OH - Gruppe von Phenolen und der im Netz vorhandenen Hohlräume, die durch ihre vergleichbare Größe eine Einlagerung des aromatischen Ringes in das Gel begünstigen, werden Phenole stark am Dextrangel adsorbiert. Diese Wechselwirkungen sind bei halogenierten Aromaten und aromatischen Carbonsäuren noch stärker ausgebildet. Zur Chromatographie von Benzoesäure und ihren Derivaten muß ein Acetatpuffer pH 2.2 als Elutionsmittel verwandt werden [65) Brook, 1970]. Der in eigenen Untersuchungen eingesetzte Wasser/Methanol - Gradient mit steigender Methanolkonzentration lieferte ebenfalls reproduzierbare Ergebnisse (s. auch IV.2.2.2).
Aus dem chromatographischen Verhalten der Fraktion B, die mit Wasser vom Sephadexgel eluiert wird und praktisch mit der Elutionsmittelfront wandert, läßt sich schließen, daß in dieser aktiven Fraktion keine Phenolcarbonsäuren vorliegen können. Spätere Untersuchungen ergaben, daß diese Annahme auf Fraktion E nicht zutrifft. Da der in der Fraktion B auftretende Keimungsinhibitor außerdem eine um den Faktor 2.5 höhere Aktivität zeigt, konzentrieren sich die weiteren Untersuchungen, die pH 1-Fraktion betreffend, auf die Fraktion B.

Bei den nachfolgenden Trennungen konnte auf die Verwendung eines Methanol/Wasser - Gradienten verzichtet werden, als Elutionsmittel diente Wasser. Zur Regenerierung des Säulenmaterials wurden die am Sephadex adsorbierten, teilweise gelben und braunen Substanzen mit Methanol abgelöst, die methanolische Lösung routinemäßig auf eventuell noch darin enthaltene Hemmaktivität geprüft und gegebenenfalls verworfen.

2. Untersuchungen zur " freien " und " gebundenen " Form des Keimungsinhibitors

Sowohl Pflanzenhormone mit keimungsfördernder Wirkung als auch keimungshemmende Substanzen kommen in "freier" und "gebundener" Form vor.
Einige Samen benötigen zur Brechung der Keimruhe eine Kälteperiode oder Licht; oder sie werden erst nach einer trockenen Lagerung, bei der eine Nachreifung erfolgt, wieder keimfähig. Gibberellinsäure (GA), die die Keimruhe dieser Samen aufzuheben vermag, wurde in Form verschiedener Glycoside neben freier GA_1 und GA_8 in Samen von Phaseolus vulgaris nachgewiesen [73) Hiraja, 1974]. Während der Nachreifung der Samen sinkt der GA - - Spiegel in vielen Fällen ab, während die Konzentration der Glycoside zunimmt, sodaß diese als inaktive Speicherformen angesehen werden können, aus denen bei Bedarf die Gibberellinsäure durch Hydrolyse freigesetzt wird [45) Taylorson, 1977]. Ähnliches ist von der Indolessigsäure (IAA), die aber keinen Einfluß auf die Keimruhe ausübt, bekannt [74) Hemberg, 1955].

Abscisinsäure (ABA), die in den meisten Samen, die kalte Stratifikation zur Brechung der Keimruhe benötigen, gefunden wird, metabolisiert während der Kälteperiode der Embryonen von Malus sylvestris und der Samen von Fraxinus excelsior zu Phaseinsäure und Dihydrophaseinsäure [71) Sondheimer, 1974]. Gleichzeitig wurde aber in den "dormanten" Embryonen von Malus sylvestris, daneben in Samen von Acer pseudoplatanus eine in geringerem Maße als die "freie" Form vorkommende, "gebundene" ABA nachgewiesen, deren Konzentration proportional zur Abnahme der freien ABA ansteigt [72 Petrova, 1974]. Das oft beobachtete erneute Auftreten von Abscisinsäure in bereits keimenden Samen wird mit der Hydrolyse dieses Glycosids erklärt [45) Taylorson, 1977].

Ferulasäure ist in Weizenkoleoptilen an Kohlenhydrate der nicht vaskulären Zellwände gebunden und wird durch Cellulasen abgespalten [75) Whitmor, 1974]. Die aus Mais und Reis isolierten cyclischen Hydroxamsäuren kommen natürlich ebenfalls mit Glucose veräthert vor. Erst nach Zerkleinerung des Pflanzenmaterials werden die Aglykone, die sich in wässriger Lösung zu Benzoxazolinonen zersetzen, enzymatisch abgespalten [76) Tipton, 1967]. Weitere Beispiele für "frei" und "gebunden" vorkommende Substanzen mit keimungshemmender Wirkung sind zahlreiche Hydroxybenzoesäure- und Zimtsäurederivate, die als Ester oder Glycoside vorliegen [68) Schmidtlein, 1975]. Es lag daher nahe, auch den oder die aus Avena sativa und A. fatua zu isolierenden Inhibitoren auf

eine mögliche Bindung zu untersuchen. Neben Informationen über Wirkungsweise und Struktur böte sich so die Möglichkeit, aus dem Ausgangsmaterial mit wenigen zusätzlichen Aufarbeitungsschritten eine höhere Ausbeute an den gewünschten Substanzen zu erzielen.

2.1 Behandlung der neutralisierten wässrigen Phase nach erfolgter Ätherextraktion bei pH 1

Zur Spaltung der in der verbleibenden wässrigen Phase vorliegenden säurelabilen Glycoside wurde mit H_2SO_4 hydrolysiert. Eventuell vorhandene Zuckeracetale, die in Gegenwart verdünnter Säuren nicht stabil sind, hätten schon bei der ersten Ansäuerung des wässrigen Extraktes eine Spaltung erfahren.

Zur Spaltung von α - glycosidischen Bindungen diente die Inkubation mit α-Glycosidase. Saccharomyces cerevisiae (Bäckerhefe) besitzt α- und β-Glycosidasen. Zur Hydrolyse β - glycosidischer Bindungen wurde die wässrige Phase einer Vergärung mit Hefe unterworfen. Zur vollständigen Erfassung aller glycosidischen oder in Form von Estern gebundenen Substanzen diente die Inkubation mit einem synthetischen Enzymgemisch. Zuckerester, die alkalilabil, aber leidlich säurestabil sind, sollten durch Behandlung mit äthanolischer NH_3 - - Lösung verseift werden.

Die nach erneutem Ansäuern der wässrigen Phasen jeweils mit Äther extrahierbaren Verbindungen wurden im Biotest mit Avena sativa, dessen Ergebnis in Tab.5 dargestellt ist, auf ihre keimungshemmende Wirkung geprüft.

Tab.5: Hemmwirkung der nach Ansäuern der wässrigen Phase erhaltenen Ätherextrakte. Die aufgeführten Hemmprozente stellen den Mittelwert aus der Wachstumshemmung von Keimwurzel und Koleoptile dar (hervorgerufen durch 10f konzentrierte Extrakte, bezogen auf Ausgangsvol.).

	% Wachstum	% Hemmung
H_2O	100	0
1. Säurebehandlung	43.5	56.5
2. Verseifung mit NH_3	12	88
3.a) Inkubation mit α-Glycosidase	73.3	26.7
b) Vergärung mit Hefe	67.7	32.3
c) Behandlung mit EL 44-78	48.2	51.8

Wie Tab.5 zeigt, führten Inkubation mit α-Glycosidase sowie Vergärung mit Hefe nicht zu dem gewünschten Ergebnis, da nur eine Keimungshemmung von 26.7 bzw. 32.3 % beobachtet wurde. Die Ätherphase nach Spaltung mit dem synthetischen Enzymgemisch EL 44-78 bewirkte ebenfalls "nur" eine Hemmung von 51.8 %, also wesentlich weniger als die, die nach Behandlung der wässrigen Phase mit Ammoniak erzielt wurde. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Schmidtlein und Herrmann überein [68) 1975], die zur vollständigen Hydrolyse aller glycosidisch und esterartig gebundenen Phenolcarbonsäuren nach Inkubation mit dem Enzymgemisch noch eine anschließende Verseifung mit $Ba(OH)_2$ oder NH_3 durchführten. Obwohl das Enzymgemisch unspezifisch wirken soll, neben Glycosidase zeigt es auch Esterase-

und Pektinaseaktivität, werden z. B. Verbindungen mit Ferula- und Sinapinsäure als Säurekomponente kaum hydrolysiert.

Ein Nachteil der Säurespaltung liegt darin, daß die in der wässrigen Phase vorhandenen Monosaccharide in Gegenwart von Protonen zu Furfurolderivaten weiterreagieren. Diese Produkte, die bei Einwirkung von Alkali nicht bevorzugt gebildet werden, sollen auch Keimungshemmung zeigen [mündliche Mitteilung von Tauscher,B.; Heidelberg].

Ein befriedigendes Ergebnis lieferte die Verseifung mit Ammoniak. Nach erneutem Ansäuern ließ sich mit Äther ein Keimungsinhibitor extrahieren, der in Bezug auf Konzentration und Wirksamkeit mit dem in der pH 1-Fraktion vorliegenden Hemmstoff vergleichbar ist (vergl. Abb.1, pH 1-Fraktion: 82 % Hemmwirkung, 10f Konz.). Ob beide Inhibitoren identisch sind, läßt sich aus den bisher durchgeführten Versuchen nicht ersehen. Das chemische Verhalten gegenüber Ammoniak läßt darauf schließen, daß der Hemmstoff als Ester vorliegt und in Säure- und Alkoholkomponente gespalten wird. Da die Aktivität nach Extraktion bei pH 1 in der Ätherphase gefunden wird, muß die Säurekomponente für die Hemmwirkung verantwortlich sein, d.h. der Hemmstoff enthält mindestens eine Carboxylgruppe. Es erscheint daher sinnvoll, die Ätherphase nach NH_3 - Verseifung bevorzugt zu untersuchen. Durch Modifizierung des Verfahrens hinsichtlich Ammoniakkonzentration und Verseifungszeit ließ sich die Aktivität noch auf 95 % Keimungshemmung steigern (10f Konzentration, Biotest mit Avena sativa).

Die endgültige Arbeitsvorschrift zur Hydrolyse und Isolierung der Säurekomponenten ist unter III.A.3.4.1 zu ersehen.

Als falsch erwies sich die Annahme, nach der Hydrolyse mit dem Enzymgemisch oder mit Ammoniak ein Gemisch zu bekommen, das neben einer hohen keimungshemmenden Wirkung wenig inaktive Komponenten enthält, da die einen erheblichen Anteil ausmachenden Phenolcarbonsäuren schon bei der ersten Extraktion bei pH 1 in die Ätherphase überführt und so der verbleibenden wässrigen Phase entzogen wurden. Wahrscheinlich liegen aber die Phenolcarbonsäuren in den Spelzen von Avena sativa ebenfalls nicht nur in freier Form, sondern auch esterartig an Mono - und Polysaccharide gebunden vor. Sie werden unter der Einwirkung von Alkali oder Enzymen gespalten und waren deshalb nach der NH_3 - Verseifung erneut in der nach Extraktion bei pH 1 erhaltenen Ätherphase, wenn auch in geringeren Konzentrationen, nachzuweisen (vergl. Abb.6 ,S. 64).

.2 Auftrennung des Ätherextraktes nach Verseifung mit NH_3

.2.1 HPLC

Die HPLC - Trennung lieferte, wie bei der pH 1-Fraktion, unbefriedigende Ergebnisse. In Übereinstimmung mit der pH 1-Fraktion (s. IV.1.2) konnte ein mit 100 % Methanol eluierbarer Peak IV isoliert werden, dessen keimungshemmende Wirkung 80 % beträgt. Weitere Auftrennung der aktiven Fraktion, die parallel zur Trennung des Peaks IV durchgeführt wurde, lieferte ebenfalls 8 Fraktionen. Die Hemmaktivität wurde in Fraktion A gefunden.

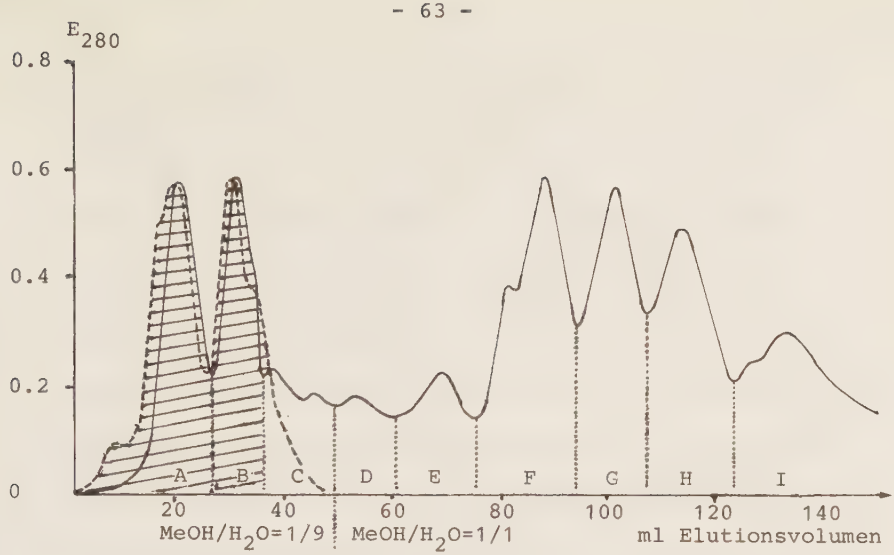


Abb.5: Elutionsdiagramm der Auftrennung eines Ätherextraktes nach Verseifung mit NH_3 (Ausgangsmaterial: 30 g Haferspelzen) an Sephadex LH 20.

(—— = vor Methylierung, --- = nach Methylierung der Fraktionen A und B und anschließender Rechromatographie

Elutionsmittel: 50 ml Methanol/H_2O = 1/9

100 ml Methanol/H_2O = 1/1

Die Schraffierung zeigt die Fraktionen mit Hemmwirkung)

2.2.2 Chromatographie an Sephadex LH 20

Eine bessere Auftrennung wurde durch direkte Chromatographie des Ätherextraktes an Sephadex LH 20 erzielt. Von den mit Hilfe des Methanol/Wasser - Gradienten erhaltenen 9 Fraktionen (s. Abb.5) riefen die Fraktionen A und B, die in der Abb.5 durch die Schraffierung gekennzeichnet sind, eine 100 %ige Keimungshemmung hervor (10f Konzentration), die restlichen Fraktionen zeigten keine Aktivität. Das Schneiden der Fraktionen erfolgte willkürlich bei 280 nm. Es muß sich bei den

aktiven Fraktionen A und B aber nicht unbedingt um 2 Hemmsubstanzen handeln, da es bisher keinen Hinweis gibt, daß die Bioaktivität mit der UV - Absorption korreliert werden kann. Vielmehr konnte bei der Reinigung der pH 1-Fraktion an Kieselgel (s. IV.1.1) gezeigt werden, daß nach Abtrennung von Substanzen, die bei 280 nm absorbieren, die Extinktion der Nebenfraktion abnimmt, obwohl die Bioaktivität erhalten bleibt.

2.2.3 Biotest der Fraktionen A - C mit der Zellkultur AN 1175 (Pimpinella anisum)

Um Informationen über den Wirkungsmechanismus des Inhibitors zu erhalten, wurden die aktiven Fraktionen A und B sowie als Vergleich die Fraktion C, die sich in den Biotests mit Avena sativa und Amaranthus caudatus als inaktiv erwies, dem Nährmedium der Zellkultur AN 1175 (Pimpinella anisum) zugesetzt (vergl. III.A.12.4).

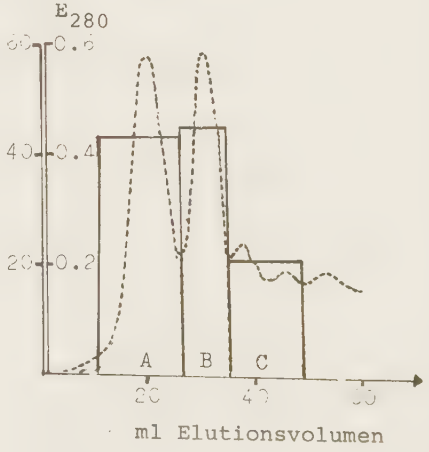


Abb.6: Hemmwirkung der Fraktionen A - C des Ätherextraktes nach Verseifung mit NH_3 nach Chromatographie an Sephadex LH 20 (---) auf das Wachstum der Zellkultur AN 1175 (Pimpinella anisum) % Hemmung (———)

Wie aus Abb.6 zu ersehen ist, zeigen die in den Keimungshemmtests aktiven Fraktionen A und B eine vergleichbare retardierende Wirkung auf das Zellwachstum (Frakt. A: 44 %; Frakt. B: 46.4 %). Die Hemmprozente wurden aus den Mittelwerten der Zellzählungen während der lag-, log- und der stationären Phase ermittelt. Auch die Fraktion C, bei der kein Einfluß auf die Keimung von Avena sativa und Amaranthus caudatus beobachtet wurde, hemmt das Wachstum der Zellen noch zu 26 %. Im Koleoptilzylindertest zeigte Fraktion A eine wachstumshemmende Wirkung von 79 %, Fraktion B von 40 % und C, in Übereinstimmung mit dem Einfluß auf das Wachstum der Zellkulturen, von 41 %. Die Wirkung von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), einem synthetischen Wachstumsstimulator, der die Embryogenese hemmt, wird ebenfalls unterdrückt. Die Embryogenese setzt in Gegenwart des Hemmstoffs ein, die Embryonen bleiben aber teilweise klein und sind deformiert. Auf Grund der Aktivität der getesteten Fraktionen im Weizenkoleoptilzylindertest konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem Inhibitor um einen Indolessigsäureantagonisten handeln muß. Durch die partielle Aufhebung der 2,4-D - - Wirkung wird diese Beobachtung bestätigt.

2.2.4 Untersuchung zum Gehalt der Spelzenextrakte an bereits in der Literatur beschriebenen Wachstums- und Keimungsinhibitoren

2.2.4.1 Prüfung der Fraktionen A - I auf Coumarine

Ungesättigte Lactone werden von vielen Autoren als Keimungsinhibitoren beschrieben. Von den von Schreiber [39) 1976] getesteten 24 natürlich vorkommenden Lactonen zeigten 12 eindeutig wachstumsretardierende und keimungshemmende Wirkung. Am besten untersucht sind Coumarin [77) Colvin, 1979], Scopoletin [78) Neish, 1965] und Xanthotoxin [79) Johnson, 1973].

Die nach Chromatographie eines Ätherextraktes nach Hydrolyse der wässrigen Phase an Sephadex erhaltenen Fraktionen A - I (vergl. IV.2.2.2) wurden daher dünnschichtchromatographisch mit den authentischen Verbindungen Coumarin und Scopoletin verglichen (s. Abb.7).

Scopoletin zeigt nach dem Lösen in Methanol eine grüne Fluoreszenz, die nach Chromatographie erhalten bleibt und durch Ansprühen mit Anisaldehyd/H_2SO_4 verstärkt wird. Eine derartige Fluoreszenz ist bei keiner der dünnschichtchromatographisch aufgetrennten Substanzen erkennbar.

Mit Hydroxylammoniumchlorid/$FeCl_3$ erschienen erst,nachdem die angesprühte Platte 24 Stunden der Luft ausgesetzt wurde, braune Flecken. Coumarin hat in dem Fließmittelsystem Benzol/Methanol/Eisessig = 40/5/2 einen R_f - Wert von 0.82, Scopoletin wird auf Grund der freien OH - Gruppe stärker zurückgehalten und besitzt einen R_f - Wert von 0.51 (s. Abb.7, Substanz 12). In dem Bereich oberhalb von 0.3 ist in keiner der neun Fraktionen

eine mit $FeCl_3$ anfärbbare Substanz vorhanden (s. Abb.7b). Die in diesen Fraktionen enthaltenen Substanzen müssen polarer sein als die Lactone und besitzen wahrscheinlich eine freie Carboxylgruppe.

Coumarin soll der stärkste Keimungsinhibitor unter den Lactonen sein [80) Wareing, 1965; 81) Mayer, 1963]. Es bewirkt erst in Konzentrationen von 1.5×10^{-4} M bei Samen von Lactuca sativa L. und 1.5×10^{-3} M bei Triticum sativum L. - Karyopsen eine 50 %ige Keimungshemmung [80) und 81)]. Die Nachweisgrenze für Coumarin in Dünnschichtchromatogrammen beträgt aber 2.56 µg/ml $\hat{=}$ 5×10^{-5}M [in "dormanten" Knospen von Acer saccharum Marsh; 100) Thakur, 1977]. Da die geprüften Lactone in den Haferspelzen im DC nicht nachweisbar sind, sind sie als Keimungsinhibitoren auszuschließen.

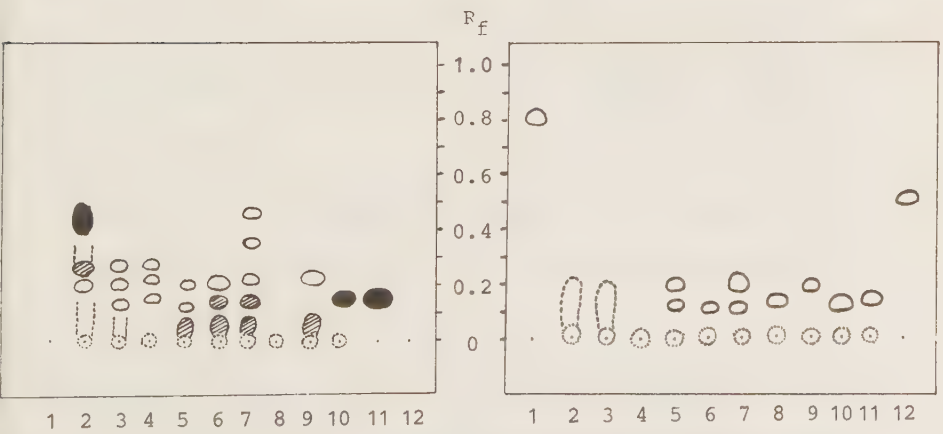


Abb.7: DC's der Fraktionen A - I und authentischer Coumarine

Platte: HPTLC Si 60 Fertigplatte; Detektionsmittel:

a) Anisaldehyd/H_2SO_4; b) Hydroxylammoniumchlorid/$FeCl_3$

1: Coumarin; 2-10: Fraktionen A-I; 11: p-Cumarsäure;

12: Scopoletin

Bei der Fraktion I handelt es sich auf Grund der Farbreaktion und des R_f - Wertes um p-Cumarsäure (s. Abb.7a). In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Brook und Munday [65) 1970] wird die aromatische Phenolcarbonsäure stark am Sephadex - Gel adsorbiert und läßt sich erst mit Wasser/Methanol = 1/1 eluieren. Die Fraktion I zeigte in der 10f Konzentration im Biotest mit Amaranthus caudatus keine Hemmwirkung.

Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der bereits erwähnten Untersuchungen von Karl [62) 1979] überein. Er konnte zeigen, daß p-Cumarsäure zusammen mit den ebenfalls in Spelzen von Avena sativa nachgewiesenen Phenolcarbonsäuren Ferula-, Vanillin- und p-Hydroxybenzoesäure in den vorliegenden Konzentrationen (insgesamt 7.5 mg/500 ml Extrakt $\hat{=} 1.15 \times 10^{-4}$ M) nicht für die durch die Spelzenextrakte hervorgerufene Hemmwirkung verantwortlich sein können.

2.2.4.2 Prüfung der Spelzen von Avena sativa auf ihren Gehalt an Benzoxazolinonen

Aus Maiskeimlingen wurden drei cyclische Hydroxamsäuren, 6,7-Dimethoxy-2-benzoxazolinon (DMBOA), 6-Methoxy--2-benzoxazolinon (MBOA) und 2-Benzoxazolinon (BOA) isoliert [90) Venis, 1978; 121) Tipton, 1967; 122) Hofman, 1969; 123) Woodward, 1978; 124) Virtanen, 1959; 125) Smissman, 1957]. Die Hydroxamsäuren wirken bakterizid und insektizid [126) Corcuera, 1978; 127) Klun, 1966]; auch ihr Einsatz als Herbizide wird beschrieben [128) Hamilton, 1964]. Venis und Watson [90) 1978] konnten

zusammen mit Hertel [66) 1977] zeigen, daß die in Mais vorkommenden Benzoxazolinone DMBOA, MBOA und BOA die Auxinbindungsstellen an Membranen, die aus Maiskoleoptilen isoliert wurden, besetzen, also als Auxinantagonisten fungieren. Die Wirkung steigt mit zunehmender Zahl an Methoxygruppen.

Untersuchungen zur Wirkungsweise der in den Haferspelzen vorliegenden Inhibitoren mit Hilfe des Auxinbindungstests [nach Hertel 66) 1977] ergaben, daß die im Amaranthuskeimtest und Weizenkoleoptilzylindertest aktive Fraktion A (Avena sativa, vergl. IV.2.2.2) zwei Komponenten enthält, die auxinantagonistische Effekte zeigen. (Die Auxinbindungstests wurden bei Prof. Hertel am Inst. f. Biologie III der Universität Freiburg durchgeführt.) Von den beiden Komponenten bindet eine spezifisch an die NAA - Bindungsstelle in der Membran und erniedrigt damit deren Affinität gegenüber dem Wuchsstoff. Die zweite Komponente zeigt dagegen eine erhöhte Affinität gegenüber einer weiteren, unspezifischen Bindungsstelle der Membran.

Auf Grund dieser Beobachtungen erhob sich die Frage, ob die bisher aus Reis [124) Virtanen, 1959], Mais und Weizen isolierten Benzoxazolinone ebenfalls in Haferspelzen als Auxinantagonisten auftreten. Daher wurden 45 g Spelzen nach der Vorschrift von Venis und Watson [90) 1978] (vergl. III.6.1 und 6.2) aufgearbeitet, der gewonnene Extrakt an Lichroprep chromatographiert und die erhaltenen Fraktionen dünnschichtchromatographisch und mit Hilfe des Weizenkoleoptilzylindertests auf Benzoxazolinone geprüft. Zu Vergleichszwecken wurden die authentischen Verbindungen

aus Maiskoleoptilen isoliert (s. III.6.1) und in der Reihenfolge BOA, MBOA und DMBOA an Lichroprep aufgetrennt; BOA konnte daneben käuflich erworben werden (Fa. Ega).

Abb.8 zeigt das Dünnschichtchromatogramm der aus den Haferspelzen isolierten Fraktionen a und b; zum Vergleich wurden die authentischen Benzoxazolinone aufgetragen.

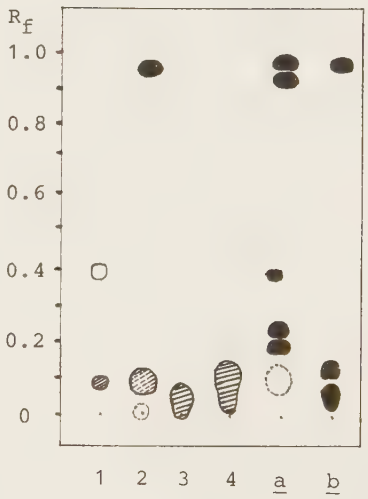


Abb.8: Dünnschichtchromatogramm der Fraktionen a und b.
Vergleichssubstanzen:
1: synthet. BOA
2: BOA; 3: MBOA; 4: DMBOA
2-4 aus Maiskoleoptilen isoliert
Platte: HPTLC Si 60
Fließmittel: Benzol/MeOH/ Eisessig = 40/5/2
Detektion: Vanillin/H_2SO_4
■ = violett; ▨ = rot

Die Benzoxazolinone bleiben bei dem verwandten Fließmittelgemisch nahezu am Start, lediglich BOA zeigt einen kleinen R_f - Wert von 0.09. Nach dem Ansprühen mit Vanillin/H_2SO_4 liefert BOA eine rote Farbreaktion, die nach Erhitzen des Chromatogramms nur noch sehr schwach beobachtet wird.Dagegen tritt die rote Farbreaktion im Falle von DMBOA und MBOA erst nach dem Erhitzen bei 120 °C (15 Minuten) auf. In der Fraktion a lassen sich drei Substanzen identifizieren, die R_f - Werte

von 0.19, 0.25 und 0.4 aufweisen. Die Verbindung mit dem kleinsten R_f - Wert läßt sich mit Vanillin/H_2SO_4 gelb, die mit dem R_f von 0.25 grün anfärben. Nach dem Erhitzen ergeben alle drei Verbindungen eine violette Farbreaktion. Fraktion b enthält zwei Komponenten, die sich mit den genannten Sprühreagenzien sichtbar machen lassen; davon befindet sich eine am Start. Es handelt sich bei dieser Substanz vermutlich aber nicht um MBOA oder DMBOA, da sie nicht rot, sondern violett angefärbt wird. Die zweite Komponente, die einen R_f - Wert von 0.13 besitzt, liefert vor dem Erhitzen eine grüne, nach dem Erhitzen ebenfalls eine violette Farbreaktion.
Aus dem Dünnschichtchromatogramm ist zu ersehen, daß aus den Haferspelzen keine Verbindung isoliert wurde, die ein mit den drei Benzoxazolinonen identisches chromatographisches Verhalten zeigt; d.h. diese Auxinantagonisten liegen vermutlich in Avena sativa nicht vor. Zur Bestätigung wurden die Fraktionen a und b (sie wurden auf Grund ihrer Absorption bei 280 nm erhalten, Benzoxazolinone besitzen Absorptionsmaxima bei 273 und 225 nm) neben DMBOA, MBOA und BOA im Weizenkoleoptilzylindertest, der zum Nachweis auxinantagonistischer Effekte dient, auf Bioaktivität geprüft. Die aus dem Spelzenmaterial isolierten Fraktionen erwiesen sich als inaktiv, während die Benzoxazolinone eine Wachstumsreduzierung der Zylinder von durchschnittlich 30 % hervorriefen (BOA: 32 %; MBOA: 28 %; DMBOA: 30 %). Im Gegensatz zu ihrer Affinität gegenüber den Auxinbindungsstellen ist also die wachstumsinhibierende Wirkung in Gegenwart von 1×10^{-5} M IAA unabhängig von der

Anzahl der Methoxygruppen am Ring. Auf Grund der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen und der fehlenden Aktivität im Weizenkoleoptilzylindertest können Benzoxazolinone als natürliche Wirkstoffe in den Spelzen von Avena sativa ausgeschlossen werden. Erwartungsgemäß ließen sich diese Verbindungen in Fraktion A ebenfalls nicht nachweisen; daher muß es sich bei den in A nachgewiesenen Auxinantagonisten um Wirkstoffe handeln, die bisher in diesem Zusammenhang noch nicht beschrieben wurden.

2.2.5 Präparative Trennung an Sephadex LH 20

Ein nach Verseifen der wässrigen Phase mit Ammoniak und anschließender Extraktion bei pH 1 aus 300 g Spelzen erhaltener Ätherextrakt wurde wie unter III.A.4.3 und IV.1.3 bei der pH 1-Fraktion beschrieben, an Sephadex LH 20 aufgetrennt.

Aus Abb.9 ist zu ersehen, daß bei dem Ätherextrakt nach Verseifung mit Ammoniak auf Grund der größeren Auftragsmenge keine Auftrennung in 2 Peaks, die Hemmaktivität zeigen, mehr erfolgt (vergl. Abb.5, S.63). Wie schon vorher erwähnt, kann die Absorption bei 280 nm nicht unbedingt mit der Bioaktivität korreliert werden.

Bei dem Versuch, größere Mengen des Hemmstoffs zu isolieren, wurde ein Ätherextrakt nach Hydrolyse der wässrigen Phase mit NH_3, erhalten aus 12 kg Haferspelzen, an Sephadex aufgetrennt. Das Eluat wurde in Portionen von je 6 ml aufgefangen und jede 20. Fraktion im Biotest mit Amaranthus caudatus auf Hemmaktivität geprüft.

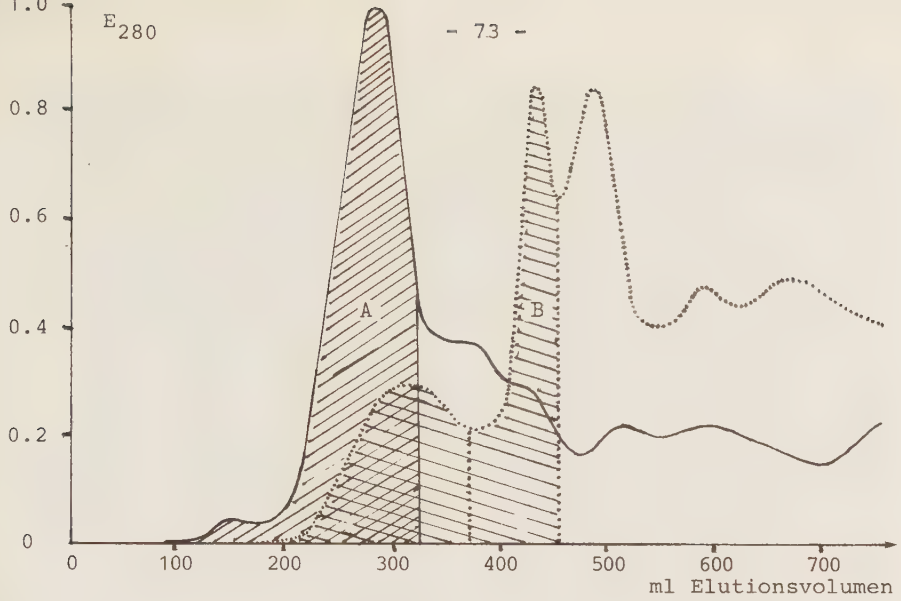


Abb.9: Elutionsdiagramm der präparativen Auftrennung eines Ätherextraktes nach Verseifen mit NH_3 (——) und einer pH 1-Fraktion (·····) aus 300 g Haferspelzen an Sephadex LH 20. Die schraffierten Flächen kennzeichnen den Hemmbereich. Elutionsmittel: H_2O; Durchflußrate: 35 ml/h

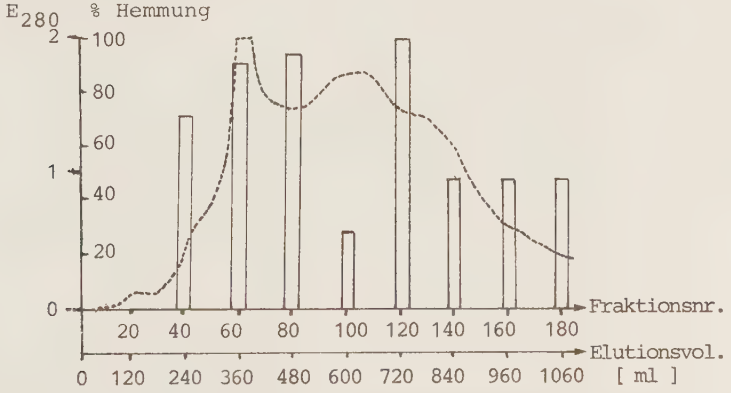


Abb.10: Vergleich der Hemmaktivitäten der Fraktionen 20 - 180, erhalten durch Chromatographie eines Ätherextraktes aus 12 kg Haferspelzen nach Hydrolyse der wässrigen Phase mit NH_3, an Sephadex LH 20, mit der Absorption dieser Fraktionen bei 280 nm. (▭) Hemmaktivität, (---) Absorption 280 nm

Aus Abb.10 geht hervor, daß z.B. bei Fraktion 100 die Absorption ein Maximum zeigt, obwohl die Bioaktivität nur 28 % beträgt. Umgekehrt bewirkt die Fraktion 80 eine Keimungshemmung von 96 % bei gleichzeitig auftretendem Absorptionsminimum. Der Biotest stellt also die bisher einzige sichere Nachweismethode für die biologisch aktiven Verbindungen dar. Die nach Methylierung durchgeführten gaschromatographischen Untersuchungen ergaben, daß der erste Hemmbereich (Fraktion 20 - 100) den in Abb.9 durch die Schraffierung gekennzeichneten Fraktionen A und B entspricht, sich wie diese aus acyclischen Säuren zusammensetzt und daher bevorzugt weiter untersucht wurde.

2.2.6 IR - Spektren der aktiven Fraktionen A und B

Die Hemmbereiche der pH 1-Fraktion und des Ätherextraktes nach ammoniakalischer Hydrolyse überlappen sich nur teilweise. Obwohl geringe Verschiebungen auf Grund einer nicht völlig gleichmäßigen Durchflußgeschwindigkeit möglich sind, ließ die größere Retentionszeit des Hemmstoffs der pH 1-Fraktion auf eine verschiedenartige Struktur der beiden Hemmstoffe schließen, v.a. da bei der Auftrennung im großen Maßstab zwei Hemmbereiche gefunden wurden. Die IR - Spektren der aktiven Fraktionen A und B (vergl. Abb.9) erwiesen sich jedoch, bis auf geringe Abweichungen im " fingerprint " - Bereich (unterhalb 1500 cm^{-1}), als identisch.

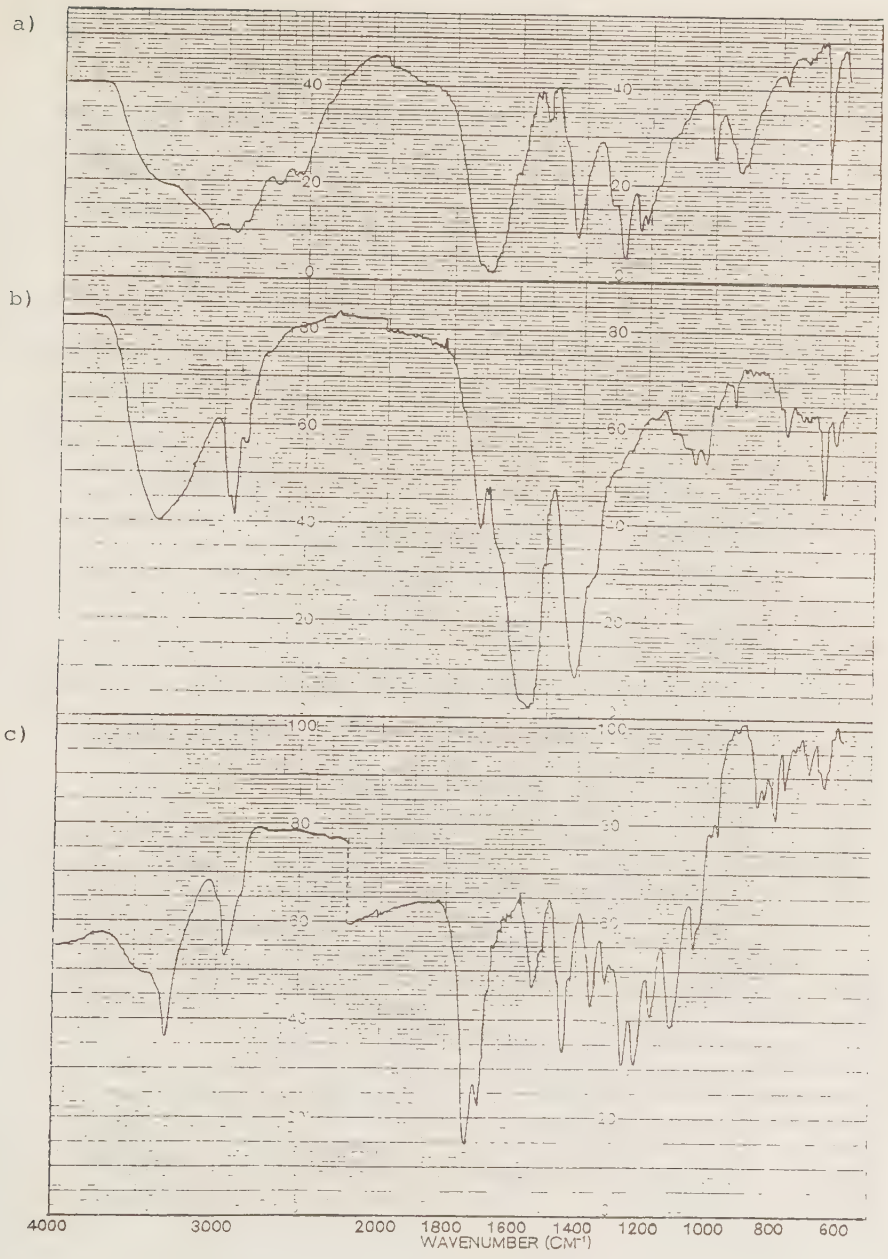


Abb.11: Infrarotspektren der Fraktion A

a) vor Methylierung; b) Ba - Salz; c) nach Methylierung

Das IR - Spektrum (s. Abb.11a) ist typisch für aliphatische Carbonsäuren. Die für Aromaten typischen Schwingungen mit Absorptionen bei 1500 und 1600 cm^{-1} treten nicht auf. Auch stickstoffhaltige Verbindungen lassen sich ausschließen. An den breiten Banden, v.a. an der breiten Carbonylbande bei 1690 cm^{-1}, die weitere Aufspaltung erkennen läßt, ist zu ersehen, daß nicht nur eine Substanz, sondern ein Gemisch mehrerer Carbonsäuren vorliegt. Nach Neutralisation der Fraktionen mit $Ba(OH)_2$ zeigt das IR - Spektrum zwei starke Banden bei 1560 und 1420 cm^{-1}, die typisch sind für Carboxylat - Ionen (s. Abb.11b).
Das IR - Spektrum der methylierten Fraktion A wird unter IV.4.2 diskutiert.

3. Versuche zur chromatographischen Trennung der in den Fraktionen A und B vorliegenden Carbonsäuregemische

3.1 Gelfiltration an Biogel P 2

Die Trennungsversuche an Biogel P 2 (s. III.A.6.2) lieferten unbefriedigende Ergebnisse. Jede der 4 erhaltenen Fraktionen bewirkte eine Keimungshemmung von 15 - 20 %. Das Biogel P 2 trennt nach steigendem Molekulargewicht auf. Um eine gute Trennung zu erzielen, ist ein Molekulargewichtsunterschied der einzelnen Komponenten von 15 - 20 % notwendig. Diese Voraussetzung scheint bei den vorliegenden Verbindungen nicht erfüllt.

3.2 Chromatographie an Lichroprep Si 60

Die Trennungsversuche wurden mit der Fraktion A (NH_3 - - Verseifung) ausgeführt. Nach dem Austesten verschiedener Fließmittel (s. III.A.6.3) wurde mit dem Elutionsmittel CH_2Cl_2/MeOH = 10/1 die relativ beste Trennung erhalten. Es ließen sich drei Fraktionen isolieren, die im Weizenkoleoptilzylindertest auf ihre Aktivität geprüft wurden: Fraktion A mit Wachstumshemmung 17 %,
Fraktion B mit Wachstumshemmung 70 % und
Fraktion C mit Wachstumshemmung 35 %.

Da die im folgenden beschriebene Methylierung der Carbonsäuren und die Anreicherung des Inhibitors in Form des Methylesters bessere Ergebnisse versprach, wurden die Versuche zur chromatographischen Trennung der freien Säuren nicht weiter verfolgt.

4. Weitere Behandlung der nach NH_3 - Verseifung und Chromatographie an Sephadex erhaltenen aktiven Fraktion A

Um die Auftrennung zu erleichtern und um ein verdampfbares Gemisch zu erhalten, das der gaschromatographischen Trennung zugänglich ist, wurden die Carbonsäuren in die Methylester überführt. Eine notwendige Voraussetzung ist, daß die keimungshemmende Wirkung des Carbonsäuregemisches nach der Umsetzung noch quantitativ nachweisbar sein muß, da der Biotest die einzige sichere Methode der Detektion darstellt.

4.1 Methylierung mit Dimethylsulfat

Die drastische Methylierung mit Dimethylsulfat führte zur Inaktivierung (oder völligen Zerstörung) des Inhibitors. Die Verwendung von Dimethylsulfat liefert außer-

dem uneinheitliche Produkte, da neben der Bildung von Estern auch alkoholische OH - Gruppen verätherт werden. Das Reagenz dient v.a. zur Alkylierung von Phenolen und aliphatischen Alkoholen [82) Cerchez, 1928].

Abb.12: Dünnschichtchromatogramm der Fraktion A vor (1) und nach (2) Methylierung mit Dimethylsulfat
Fließmittel: CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 20/40/1
Platte: HPTLC Si 60
Detektion: Vanillin/H_2SO_4 bei 120 °C 10 Min. entwickelt
▨ braun; ■ rot;
▩ blau; ▦ grau

Abb.12 zeigt das Dünnschichtchromatogramm einer Fraktion A, erhalten durch Auftrennung an Sephadex LH 20, vor und nach der Methylierung mit Dimethylsulfat. Da die Probe 2 keine Keimungshemmung bewirkt, sollte, falls der Inhibitor mit dem Universalreagenz Vanillin/H_2SO_4 anfärbbar ist, in der Fraktion A eine Substanz auf dem Chromatogramm erscheinen, die nach der Methylierung nicht mehr nachzuweisen ist. Eindeutig ihre Position verändert haben die beiden Substanzen mit den kleinsten R_f - Werten (0.07 und 0.12). Die rot anfärbbare Verbindung ist wahrscheinlich zum R_f 0.32 verschoben. Es konnte aber in Vorversuchen gezeigt werden, daß die Hemmaktivität auch unter Verwendung des oben aufgeführten Fließmittelsy-

stems in einem R_f - Bereich zwischen 0.5 und 0.9 lokalisiert sein muß. Alle Verbindungen mit kleineren R_f - Werten können daher als potentielle Inhibitoren ausgeschlossen werden. Die in Probe 2 auftretenden Flecken weisen größere R_f - Werte auf, was für eine erfolgte Methylierung spricht. Die Lokalisierung des Inhibitors auf dem Chromatogramm ist aber nicht möglich. Es zeigt aber, daß die Fraktion A nach Trennung an Sephadex noch mindestens 8 verschiedene Verbindungen enthält.

4.2 Methylierung mit Diazomethan

Nach Einwirken von Diazomethan auf die durch Auftrennung eines Ätherextraktes nach Hydrolyse mit NH_3 erhaltene Fraktion A blieb die Hemmwirkung bestehen.

Tab.6: Ergebnisse der Biotests nach Methylierung von A mit Diazomethan

Probe	% Wachstum	% Hemmung
Fraktion A, methyliert (10f Konz.)	0	100
nicht umgesetzter Rückstand	100	0
5 ml Diazomethan, eingeengt, in 1 ml H_2O aufgenommen	100	0

Die in Tab.6 aufgeführten Ergebnisse wurden im Biotest mit Amaranthus caudatus als Testsaatgut erzielt. Im Biotest mit Avena sativa unterdrückten die Methylester

(10f Konz.) die Keimung der Karyopsen ebenfalls völlig, obwohl der Saathafer auf die Keimungsinhibitoren unempfindlicher reagiert [62) Karl, 1979]. Zur Überprüfung der Reaktion wurde ein IR - Spektrum der Methylester aufgenommen (s. Abb.11c). Die für Carbonsäuren typische, breite Absorptionsbande von 3200 - 2500 cm^{-1}, hervorgerufen durch Hydroxylgruppen, die intramolekular starke Wasserstoffbrücken des chelaten Typs ausbilden, ist verschwunden. Dafür tritt bei 3320 cm^{-1} die scharfe Bande einer freien OH - Gruppe auf, die im Spektrum der Carbonsäuren durch die " polymere " OH - Absorptionsbande überlagert wird. In dem Carbonsäureestergemisch müssen neben gesättigten bzw. ungesättigten Vertretern auch Hydroxycarbonsäureester vorliegen. Die Carbonylabsorptionsbande setzt sich aus zwei sich überlagernden Banden zusammen; die Hauptbande tritt bei 1738 cm^{-1} auf und ist typisch für gesättigte Ester. Eine zweite, weniger intensive Bande erscheint bei 1700 cm^{-1}. Es handelt sich hier vermutlich um die Carbonylschwingungen der Säure, die nicht vollständig methyliert wurde, oder um die C=O - Bande von Ketocarbonsäureestern. Die Aufspaltung der C=O - Schwingung der Ester zeigt, daß Carbonylgruppen mit unterschiedlicher chemischer Umgebung vorliegen müssen.

Von den zu Vergleichszwecken aufgenommenen Spektren verschiedener Mono-, Di- und Tricarbonsäureester weisen die Spektren von Citronensäuretrimethylester und Äpfelsäuremethylester die größte Übereinstimmung mit dem IR - Spektrum der methylierten Fraktion A auf.

Bei dem hier gewählten Methylierungsverfahren (direkte Zugabe einer ätherischen Diazomethanlösung zu der gefriergetrockneten Probe) verblieb ein in Äther unlöslicher, in Methanol löslicher Rückstand, der sich auch bei Nachmethylierung nicht umsetzte. Dieser in Wasser schwerlösliche Rückstand zeigte keine biologische Aktivität, er besteht wahrscheinlich zum Teil aus höhermolekularen Verbindungen (s. Tab. 6, S. 79). Ein Vorteil der Methylierung mit Diazomethan besteht darin, daß das Reagenz nur in Lösung stabil ist und nach Abblasen des Äthers überschüssiges Diazomethan spontan zu N_2 und Carben zerfällt und keine Rückstände hinterläßt. Um Artefakte auf jeden Fall auszuschalten, wurden 5 ml einer konzentrierten ätherischen Diazomethanlösung eingeengt und in 1 ml H_2O bidest. aufgenommen. Diese Lösung zeigte erwartungsgemäß keine Hemmwirkung.

Im Gegensatz zu Dimethylsulfat werden mit Diazomethan nur Säuren bis zur Säurestärke des Phenols methyliert. Man erhält aber nur dann einheitliche Produkte, wenn die Methylierung bei tiefen Temperaturen ausgeführt wird und das überschüssige Diazomethan direkt nach Beendigung der Stickstoffentwicklung entfernt wird (mündl. Mitteilung von Dr. Schäfer, MPI Martinsried). Bei einer längeren Einwirkungszeit (im vorliegenden Fall 12 Std.) ist aber eine Alkylierung von OH - Gruppen nicht auszuschließen. Mit Hilfe der GC - MS wurde neben Äpfelsäuredimethylester auch Methoxybernsteinsäuredimethylester nachgewiesen (s. unter IV.4.4).

4.3 Sublimation der methylierten Fraktion A

Bisher wurde nicht hinreichend bewiesen, daß er sich auch bei dem Hemmstoff um eine Carbonsäure handelt. Wie schon erwähnt, setzt sich die Fraktion A aus mindestens 8 Substanzen zusammen. Da Phytohormone in sehr geringen Konzentrationen in den Pflanzen vorkommen (< 1 µg/g), ist die Möglichkeit, daß der Keimungsinhibitor nur eine Nebenkomponente mit einer abweichenden chemischen Struktur darstellt und das IR - Spektrum von inaktiven Hauptkomponenten erhalten wurde, nicht auszuschließen.
Die aktiven Fraktionen A und B der analytischen Sephadex - Säule (s. IV.2.2.2) wurden nach Methylierung unter den gleichen Bedingungen rechromatographiert. Wie aus Abb.5 (S.63) zu ersehen ist, ist kein signifikanter Unterschied im Elutionsverhalten der Fraktionen vor und nach Behandlung mit Diazomethan zu beobachten. Auch die Aktivität wurde im gleichen Bereich (schraffiert) wie vor der Methylierung gefunden. Die Rechromatographie lieferte daher keine Hinweise auf eine Methylierung des Inhibitors mit Diazomethan. Zur Klärung dieses Problems wurde eine Sublimation durchgeführt. Carbonsäureester zeichnen sich durch ihre gegenüber den freien Säuren erhöhte Flüchtigkeit aus. Auf Grund ihrer niedrigen Schmelzpunkte stellen sie überwiegend Flüssigkeiten dar. Bei Sublimationsversuchen vor der Methylierung (Ölbadtemperatur: 100°C, Ölpumpenvakuum) ließ sich keine Bioaktivität im Sublimat, sondern nur im Sublimationsrückstand nachweisen. Nach längerem Erhitzen (bis 200°C Ölbadtemperatur) wurde die Aktivität völlig zerstört. Nach

Methylierung der Fraktion A (präparative Trennung, s. Abb.9, S.73) läßt sich der Inhibitor dagegen quantitativ sublimieren. Das Sublimat (10 f konz.) unterdrückt die Keimung von Amaranthus caudatus zu 100 %, während der Sublimationsrückstand (dunkel gefärbte Produkte) keine Hemmaktivität zeigt. Durch die Sublimation wird außerdem ein zusätzlicher Reinigungseffekt erzielt, da das Verhältnis von aktivem Sublimat zu nicht aktivem Rückstand 1 : 3 beträgt. Die Sublimierbarkeit des Hemmstoffs läßt folgende Schlüsse zu:

a) der Inhibitor besitzt mindestens eine mit Diazomethan leicht zu methylierende Carboxylfunktion,
b) der Methylester zeigt eine Hemmwirkung, die mit der der freien Säure vergleichbar ist.

Daher trifft die von einigen Autoren geäußerte Ansicht, die keimungshemmende Wirkung beruhe auf der durch die Carbonsäuren erzeugte pH - Erniedrigung des Mediums, auf den Inhibitor aus Avena sativa nicht zu. Myrmicacin, eine aus den Sekreten von Atta sexdens (südamerikanische Blattameise) isolierte Verbindung, deren Struktur von Schildknecht und Koob [83) 1971] aufgeklärt wurde - es handelt sich um β-Hydroxydecansäure - hemmt die Keimung und das Wachstum von Camellia sinensis L. (Teestrauch). Die Hemmung wird aber nur bei Säurekonzentrationen, die einen pH - Wert der Lösung von 3.9 - 4.0 bewirken, beobachtet. Lösungen mit pH - Werten um 5.5 zeigen keinen Effekt mehr. Der pH - Wert mag auch bei der von den Wurzeln von Chenopodium album L. (Gänsefuß) ausgeschiedenen Oxalsäure eine Rolle spielen. Oxalsäure hemmt in Konzentrationen von

$2.5 - 5 \times 10^{-3}$ M das Längenwachstum der Hauptwurzel keimender Maissamen [84) Caussanel,1979]. Eigene Messungen ergaben, daß eine 2.5×10^{-3} M Oxalsäurelösung einen pH - - Wert von 2 besitzt. Eine H_2SO_4 - Lösung mit pH 2 ruft im Weizenkoleoptilzylindertest eine völlige Wachstumshemmung hervor. In den geringen Konzentrationen, in denen potente Keimungsinhibitoren wie Abscisinsäure oder Phaseinsäure ihre Wirkung entfalten ($1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-8}$ M), üben sie auf den pH - Wert keinen Einfluß aus. Untersuchungen an diesen Inhibitoren zeigten dagegen, in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen über den Hemmstoff aus Avena sativa, daß die Methylester die gleiche keimungshemmende Wirkung besitzen wie die freien Säuren. Phaseinsäuremethylester ist im Kressekeimtest in Konzentrationen von 1×10^{-7} M wirksam [85) Franssen et al., 1979]. Das gleiche gilt für 4-Desoxyphaseinsäuremethylester, der im Wachstumstest mit Reispflanzen (Oryza sativa) eine höhere wachstumsretardierende Wirkung besitzen soll als Abscisinsäure [86) Tamura, 1970]. Ein aus der Gartenbohne (Pisum sativum) isolierter, endogener Keimungs- und Wachstumsinhibitor wurde als Abscisinsäuremethylester identifiziert. Der Methylester, der nicht als solcher in der Pflanze vorliegt, sondern erst nach Umsetzung einer aktiven Fraktion mit Diazomethan erhalten wird, zeigt, ebenso wie 4-Desoxyphaseinsäuremethylester, im Wachstumstest mit Reiskeimlingen eine höhere Aktivität als die Säure [87) Isogai, 1970; 88) Koshimizu, 1966].

Karl [62) 1979] konnte zeigen, daß sich bei der HPLC an Reverse - Phase RP 8 die Hemmaktivität der pH 1-Fraktion

deutlich von Abscisinsäure abtrennt. Er schloß Abscisinsäure daher als eine der keimungshemmenden Substanzen der pH 1 - Fraktion aus. In einer Arbeit von Zemanova [89) 1970] wird Abscisinsäure als der Keimungsinhibitor des Flughafers (Avena fatua), der v.a. in den Karyopsen lokalisiert ist, beschrieben. Berrie [35) 1979] weist freie und "gebundene" ABA in den Spelzen sowohl von A. sativa als auch von A. fatua nach; er kann die Länge der Keimruhe jedoch nicht mit der Konzentration an freier ABA in den Spelzen korrelieren. Neben ABA sollen niedere Fettsäuren (C_6 - C_{10}) einen Einfluß auf die Keimruhe von A. sativa ausüben. Diese leicht flüchtigen Verbindungen werden in dieser Arbeit jedoch nicht weiter berücksichtigt, da Karl[62) 1979] nach Gefriertrocknung eines Rohextraktes aus den Spelzen von A. sativa lediglich eine Abnahme der Hemmaktivität von 15%, bedingt durch den Verlust flüchtiger Substanzen im angelegten Vakuum, beobachtet. Daraus ist zu ersehen, daß die kurzkettigen Fettsäuren nur zu einem geringen Teil zu der durch den Spelzenextrakt hervorgerufenen Keimungshemmung beitragen. Die Prüfung auf ABA bzw. deren Methylester in der methylierten und gereinigten Fraktion A wurde dünnschichtchromatographisch wiederholt. ABA und ihr Methylester zeigen eine charakteristische grüngelbe Fluoreszenz im UV - Licht und ergeben mit Anisaldehyd/H_2SO_4 eine grüne Färbung. Eine Substanz, die diese Charakteristika aufweist, konnte in Fraktion A nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchung der aktiven Fraktion B (pH 1 - Fraktion, s. Abb.4, S.54) auf ABA lieferte ebenfalls ein negatives Ergebnis.

4.4 GC/MS - Trennung der methylierten, sublimierten Fraktion A

Zur Bestimmung der Anzahl der in Fraktion A nach Methylierung und Sublimation nebeneinander vorliegenden Verbindungen wurde eine gaschromatographische Trennung durchgeführt. Abb.13 (S.87) zeigt das Gaschromatogramm der Fraktion A nach Auftrennung an einer OV 101 - Säule. Es enthält eine Hauptkomponente (7) mit der Retentionszeit (RT) von 12.9, das entspricht einer Säulentemperatur von 100°C. Im Vergleich dazu zeigt das Gaschromatogramm der GC/MS - Trennung (Abb. 14, S. 88), die an einer SP 1000 - Säule durchgeführt wurde, daß neben der Hauptkomponente noch mindestens 10 Nebenkomponenten auftreten, die als Inhibitor in Frage kommen. Auf der im Vergleich zur OV 101 - Säule polareren SP 1000 - Säule besitzen unpolare Verbindungen kürzere Retentionszeiten, während polare Substanzen wie Carbonsäureester mit freien OH - Gruppen stärker zurückgehalten werden.
Die große Anzahl der Peaks im Bereich kleinerer Retentionszeiten zeigt, daß die Nebenkomponenten überwiegend unsubstituierte aliphatische Ester sind. Nach Trimethylsilylierung der Probe zum Nachweis von Verbindungen mit OH - Gruppen ändern nur die Peaks 7 (Hauptkomponente) und 8 ihr chromatographisches Verhalten.
Die Massenspektren der beiden Substanzen zeigen die typischen Schlüsselbruchstücke 73 $[(H_3C)_3Si]^+$ und 89 $[(H_3C)_3SiO]^+$ von Trimethylsilylverbindungen.
Retentionszeiten und Massenspektren der Komponenten 1 - 4 bleiben unverändert.

Abb.13 Gaschromatogramm der Fraktion A (Ätherphase nach Verseifung mit NH_3, an Sephadex chromatographiert)
Säule: Glaskapillarsäule OV 101, 25 m; weitere GC - Bedingungen s. III.B.3, S. 41; RT = Retentionszeit
Die Ziffern bezeichnen die Substanzen in Tab.7, S.89

Tab.7 zeigt die durch Vergleich mit den Massenspektren und Gaschromatogrammen des authentischen Materials ermittelten Strukturen der Substanzen 1, 2, 3b, 4 sowie 7 und 8. Als Hauptkomponente ist in der Fraktion A Äpfelsäuredimethylester (7) enthalten.

Bei gesättigten und α-methylsubstituierten Dicarbonsäureestern ist der Molekülpeak nur sehr schwach oder fehlt ganz. Als erstes intensives Fragment findet man [M^+-OCH_3]. Bei α-Hydroxy- und α-Methoxydicarbonsäureestern sowie Hydroxytricarbonsäureestern ist die Abspaltung von [$COOCH_3$]$^\cdot$ bevorzugt [93) Spiteller, 1979]. Die Massenspektren von Äpfelsäuredimethylester und Methoxybernsteinsäuredimethylester liefern daher intensive Signale bei m/e 103 und m/e 117.

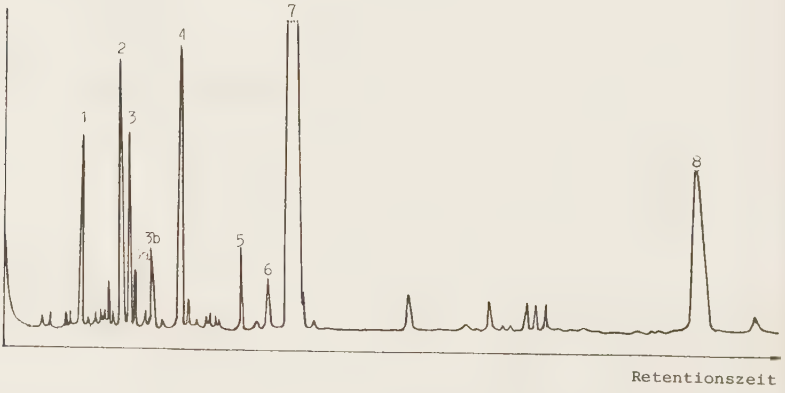


Abb.14: Gaschromatogramm der GC/MS - Trennung der Fraktion A (Ätherphase nach Verseifung mit NH_3 an Sephadex chromatographiert)

Säule: Glaskapillarsäule SP 1000, 50 m

Temperaturprogramm: 120 - 170 °C; 3 °C/min

restliche Bedingungen siehe III.B.3, S.41

Die Ziffern bezeichnen die Substanzen in Tab.7, S.89.

Tab.7: Massenspektrometrische Identifizierung der nach GC/MS - Trennung der Fraktion A erhaltenen Komponenten

(Die angegebenen Komponenten wurden - soweit sie durch Massenspektren erfaßt wurden - im Gaschromatogramm Abb. 14 nach steigenden Retentionszeiten nummeriert)

Nr.	Summenformel Name d. Verbindg.	Strukturformel	MG	Massenspektrum m/e (% rel. Int.)	MS der authentischen Verbindung
1	$C_5H_8O_4$ Malonsäuredimethylester	$H_3COOC-CH_2-COOCH_3$	132	132(4), 101(100), 74(53), 59(94), 57(32), 45(5)	132(32), 101(72), 74(44), 59(100), 45(66)
2	$C_6H_{10}O_4$ Bernsteinsäuredimethylester	$H_3COOC-CH_2$ $H_3COOC-CH_2$	146	115(100), 114(27), 87(15), 59(18), 55(26)	115(100), 114(27), 101(5), 87(25), 59(72), 55(74)
3b	$C_7H_{12}O_5$ Glutarsäuredimethylester	$H_3COOC-CH_2-CH_2$ $H_3COOC-CH_2$	160	129(86), 128(67), 101(65), 100(96), 87(30), 74(11), 69(6), 59(100), 58(11), 55(60)	129(79), 128(28), 101(90), 100(70), 87(47), 74(10), 69(9), 59(100), 55(72)
4	$C_7H_{12}O_5$ Methoxybernsteinsäuredimethylester	$H_3COOC-CH-OCH_3$ $H_3COOC-CH_2$	176	146(7),117(68), 85(3), 75(100), 59(21), 55(5), 47(7), 45(5)	117(38), 85(7), 75(100), 59(22), 55(10), 47(11), 43(10)
5	$C_9H_{16}O_5$ Isopropyläpfelsäuredimethylester	$H_3COOC-CH_2$ $H_3COOC-C(OH)(CH_3)-CH-CH_3$	204	161(9), 145(65), 127(17), 113(21), 102(14), 101(28), 85(4), 74(11), 71(100), 59(12) 45(5)	161(7), 145(50), 130(7), 129(7), 127(7), 113(20), 102(17), 101(24), 74(14), 71(100), 59(20), 43(91)
6	$C_8H_{14}O_5$ β-Hydroxy--β-Methyl-glutarsäuredimethylester	$H_3COOC-CH_2-C(CH_3)(OH)$ $H_3COOC-CH_2$	190	175(7), 143(33), 117(100), 101(26), 85(77), 75(13), 74(12), 59(14)	175(5), 157(11), 143(29), 141(15), 117(100), 101(23), 85(72), 74(21), 59(25)
7	$C_6H_{10}O_5$ Äpfelsäuredimethylester	$H_3COOC-C(OH)$ $H_3COOC-CH_2$	162	131(9), 130(7), 113(7), 104(6), 103(100), 74(8), 71(81), 61(47), 59(24)	131(3), 114(54), 103(71), 85(28), 75(93), 71(82), 59(45), 43(100)
8	$C_9H_{14}O_7$ Citronensäuretrimethylester	$H_3COOC-CH_2$ $H_3COOC-C(OH)$ $H_3COOC-CH_2$	234	175(20), 152(4), 144(8), 143(100), 111(4), 101(66), 69(9), 59(23), 57(9)	175(14), 143(100), 111(6), 101(82), 75(7), 69(13), 59(36), 57(12)

Die Abspaltung von 59 ME führt bei Citronensäuretrimethylester zu m/e 175. Bei den von Eliasson aus Rattenurin isolierten Tricarbonsäuren [94) 1976], die in Form ihrer Methylester massenspektrometrisch analysiert wurden, wird, wie bei gesättigten Dicarbonsäureestern, als erstes signifikantes Fragment [M^+-$-OCH_3$] beobachtet. Glutarsäuredimethylester besitzt ein zur Carboxylgruppe γ-ständiges Wasserstoffatom. Hier ist die McLafferty - Umlagerung zum Ion m/e 74 energetisch bevorzugt.

Den Komponenten 5 und 6 werden aus dem Vergleich mit Literaturdaten [93) Spiteller, 1979] die Strukturen von Isopropyläpfelsäuredimethylester und β-Hydroxy-β-methylglutarsäuredimethylester zugeordnet. Methoxybernsteinsäuredimethylester, der im Verhältnis 1:5 neben Äpfelsäuredimethylester vorliegt (s. Abb.13 und 14), entsteht wahrscheinlich nach längerem Einwirken von Diazomethan aus Äpfelsäure und kann nicht als Naturprodukt angesehen werden.

Die synthetischen Ester 1, 2, 3b, 7 und 8 wurden in Konzentrationen von 1 und 2 x 10^{-4} M auf Hemmwirkung geprüft. Erwartungsgemäß zeigten sie keine Aktivität; bei Malonsäuredimethylester und Äpfelsäuredimethylester war eine eindeutig wachstumsfördernde Wirkung zu beobachten. Tetjurew [95) 1941] führt die durch das Fruchtfleisch von Malus silvestris hervorgerufene Keimungshemmung auf den Gehalt des Apfelfruchtfleisches an Citronensäure und Äpfelsäure zurück. Eine signifikante Hemmung wird aber erst in 1 %igen Lösungen beob-

achtet, und der Hemmeffekt ist im vorliegenden Fall bei Verwendung der neutralen Salze nahezu aufgehoben. Die Inhibitorwirkung ist vermutlich auf Konzentrations- und pH - Effekte zurückzuführen. Gegen einen retardierenden Einfluß der oben genannten organischen Säuren auf die Samenkeimung sprechen auch die Untersuchungen von Takahashi [96) 1962], der die Induktion der Dunkelkeimung von 15 Monate gelagerten Tabaksamen (Nicotiana tabacum L.) in Gegenwart von 1×10^{-2} M Äpfelsäure-, Citronensäure- und Bernsteinsäurelösungen beobachtete.

Nach diesen Ergebnissen erhob sich die Frage, welche Komponenten der Fraktion A als mögliche Inhibitoren angesehen werden können. Neben den in Tab.7 aufgeführten Verbindungen und der nicht identifizierten Komponente (3a) erscheinen im Gaschromatogramm eine Reihe von Peaks, die auf Konzentrationen der Komponenten von <3 ng/µl hinweisen (als Standard diente authentischer Äpfelsäuredimethylester: Peakhöhe 10 cm, entsprechend der rel. Absorption 55, entspricht 50 ng Äpfelsäuredimethylester). Konzentrationsberechnungen mit einem angenommenen Molekulargewicht des Inhibitors von ca. 200 ergaben unter der Annahme, daß er in einer Verdünnung von 1×10^{-5} M wie viele Phytohormone noch Hemmwirkung zeigt, daß auch eine der bisher vernachlässigten Nebenkomponenten als Hemmstoff in Frage kommt.

5. Identifizierung des Hemmstoffs

Auf Grund der oben angeführten Berechnungen war es erforderlich, den Hemmstoff weiter anzureichern und ihn im GC zu identifizieren.

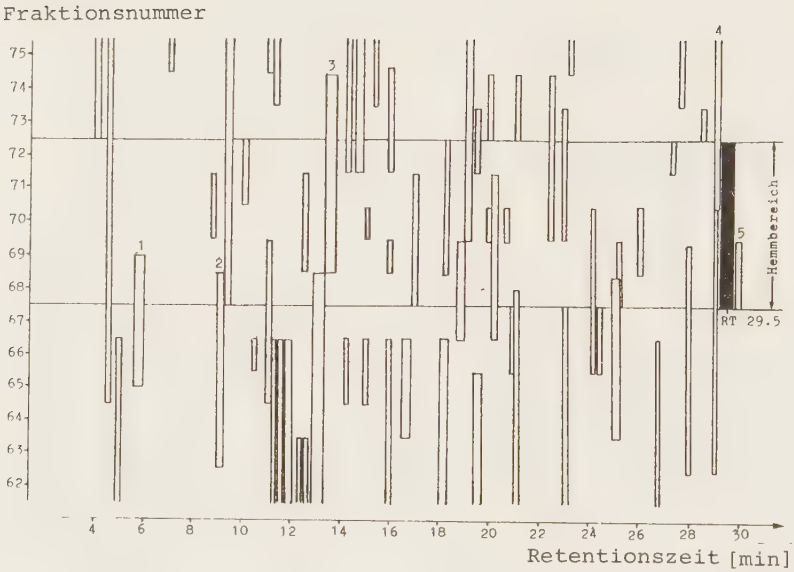
5.1 Chromatographie der methylierten, sublimierten Fraktion A an Lichroprep

Die Methylester der Fraktion A wurden an Lichroprep Si 60 mit Hilfe eines Hexan/ Essigester - Gradienten aufgetrennt, das Eluat in Fraktionen von je 0.5 ml aufgefangen und jede dieser Fraktionen dem Amaranthuskeimtest unterworfen. Die hemmenden Fraktionen und die Fraktionen in der Umgebung des Hemmbereichs wurden gaschromatographisch analysiert.

Die Hemmaktivität wurde im Bereich von Fraktion 68 - 72 gefunden (s. Abb.16, S.94) und erreichte in den Fraktionen 69 und 70 ein Maximum (s. Abb.17, S.95).

Abb.15 zeigt das Gaschromatogramm der aktiven Fraktion 70. Man beobachtet eine Hauptkomponente mit der Retentionszeit 29.5 min und daneben eine Substanz mit der Retentionszeit 29 min, die ca. 50 % der Hauptkomponente ausmacht und zahlreiche weitere Nebenkomponenten mit kleineren Retentionszeiten. Zur Lokalisation der für die Hemmwirkung verantwortlichen Verbindung im Gaschromatogramm wurden die in den aktiven Fraktionen auftretenden Komponenten mit denen in den inaktiven Fraktionen enthaltenen verglichen: Wie aus Abb.16, S.94 zu ersehen ist, ist nur die Substanz mit der Retentionszeit 29.5 in allen aktiven Fraktionen vertreten.

Abb.15: Gaschromatogramm der Fraktion 70 der Chromatographie an Lichroprep (Bedingungen s. III.B.3; Säule OV 101)

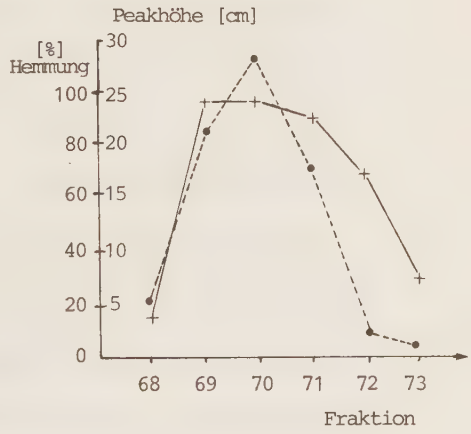


.16: Aufschlüsselung der nach gaschromatographischer Trennung bei verschiedenen Retentionszeiten erscheinenden Substanzen nach ihrem Vorkommen in den Fraktionen 62 - 75. Die Balkenstärke gibt die ungefähre Konzentration der jeweiligen Komponenten nach der Anreicherung an.

Die Nebenkomponenten der Fraktion 70 treten entweder auch in nicht aktiven Fraktionen auf bzw. sie können nicht in jeder Hemm - Fraktion nachgewiesen werden. Um den Verdacht, daß es sich bei dem Peak " RT 29.5 " um den gesuchten Hemmstoff handeln könnte, zu erhärten, wurde versucht, die durch die Fraktionen 68 - 72 hervorgerufenen Keimungshemmung mit der Peakhöhe des Peaks " RT 29.5 " im Gaschromatogramm, d.h. mit der in den

Fraktionen enthaltenen Hemmstoffkonzentration, zu korrelieren. Vergleicht man Peakhöhe und Hemmwirkung der aktiven Fraktionen, so erhält man zwei analog verlaufende Kurven (Abb.17). Die Hemmkurve verläuft nur im Maximum etwas flacher, da die Hemmwirkung in Fraktion 69 und 70 einen Sättigungswert erreicht. Da das Ausmaß der Keimungshemmung mit der Intensität des Peaks " RT 29.5 " korreliert werden kann und keine der zahlreichen ebenfalls nachgewiesenen Komponenten, wie bereits erläutert, eine Inhibitorwirkung zeigt, muß die Verbindung mit der Retentionszeit 29.5 min als der gesuchte Inhibitor angesehen werden.

Abb.17: Korrelation der Hemmwirkung der Fraktionen 68 - 73 (erhalten durch Chromatographie der Fraktion A, meth., subl., an Lichroprep, in der Abb. +——+) und der Intensität des Peaks "RT 29.5" im Gaschromatogramm (in der Abb. •---•)



Im Gaschromatogramm der methylierten, durch Sublimation gereinigten Fraktion A, vor der Auftrennung an Lichroprep (s. Abb.13, S.87), erscheint bei der Retentionszeit von 29 - 30 min. ein Triplett, das insgesamt nur etwa 15 % der Intensität der Hauptkomponente ausmacht.

Der mittlere Peak (Intensität: 1.5 % bezogen auf Äpfelsäuredimethylester) stellt den Hemmstoff " RT 29.5 " dar. Der vordere " Haupt "- Peak mit der Retentionszeit von 29 min. tritt, wie aus Abb.15 zu ersehen ist, neben dem Hemmstoff in Fraktion 70 auf. Er wird aber auch in den inaktiven Fraktionen 73-75 gefunden (vergl. Abb.16, S.94) und kann daher nicht für die beobachtete Hemmung verantwortlich sein. Der dritte Peak des Tripletts (RT 30) ist in den Hemmfraktionen 70 - 72 nicht nachzuweisen. Die Vermutung, es handele sich bei den drei Substanzen um Stereoisomere, wurde für die Komponenten mit RT 29 und RT 29.5 nicht bestätigt, da die Molekulargewichte und die MS - Fragmentierungen unterschiedlich sind. Die bereits identifizierten Komponenten (s. Tab.7) Malonsäure- (1) und Bernsteinsäuredimethylester (2) treten als Verunreinigungen am Anfang des Hemmbereichs auf. Da der Hemmstoff an Kieselgel ein ähnliches chromatographisches Verhalten zeigt wie die genannten aliphatischen Dicarbonsäureester, weist er vermutlich keine freie OH - Gruppe auf, was durch Trimethylsilylierung der Probe 70 bestätigt werden konnte. Nach der Behandlung mit TMS konnte keine Veränderung der Retentionszeit beobachtet werden,und auch das MS blieb unverändert. Auf Grund der größeren Retentionszeit nach Trennung an Kapillarsäulen müssen aber signifikante Molekulargewichtsunterschiede zwischen dem Hemmstoff und den einfachsten Dicarbonsäureestern bestehen. Die α-OH- substituierten Di- und Tricarbonsäureester

wie Äpfelsäuredimethylester bzw. Citronensäuretrimethylester ließen sich erst mit dem Elutionsgemisch Hexan/Essigester = 1/1 vom Kieselgel eluieren und traten daher nach dem Hemmbereich in Erscheinung. Äpfelsäuredimethylester stellt die Hauptkomponente der Fraktionen 85 - 95 dar. Er läßt sich nach dünnschichtchromatographischer Trennung auf HPTLC - Platten durch Ansprühen mit Dihydroxynaphthalin/konz. H_2SO_4 und anschließendem Entwickeln bei 120 °C sichtbar machen und diente bei der Säulenchromatographie an Lichroprep als " Marker ".

Als schwierig erwies sich die Abtrennung des Hemmstoffs von Methoxybernsteinsäuredimethylester, der, wie der Inhibitor, mit einem Essigesteranteil von 25 % am Gradienten eluiert wird und als Hauptkomponente in den Fraktionen 71 und 72, in geringem Maße auch in Fraktion 70 auftritt (vergl. Abb.16, 3). Er ist aber überwiegend in den Fraktionen 73 und 74, die keine Keimungshemmung zeigen, enthalten. Die authentische Verbindung erwies sich außerdem als inaktiv. Dieses Trennproblem ließe sich evtl. durch ein modifiziertes Methylierungsverfahren, bei dem spezifisch Carboxylfunktionen methyliert werden, umgehen, da, wie schon vorher erwähnt, Methoxybernsteinsäuredimethylester wahrscheinlich erst nach längerem Einwirken von Diazomethan auf Äpfelsäure entsteht.

Durch Chromatographie an einer Reverse - Phase RP 8 - Säule mit Hilfe der HPLC und anschließender Rechromatographie an Lichroprep ließen sich die Hemmfraktionen

weiter aufreinigen, sodaß sie im wesentlichen nur noch den Hemmstoff enthielten (Abb. 18). Durch einen nach der Reinigung durchgeführten Biotest wurde bestätigt, daß die Substanz mit der Retentionszeit 29.5 für die Hemmwirkung verantwortlich ist.

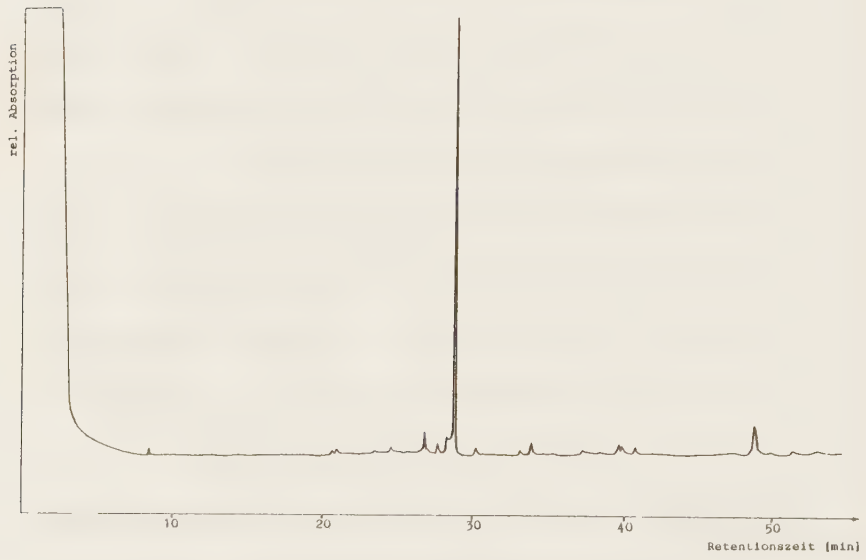


Abb.18: Gaschromatogramm des Hemmstoffs "RT 29.5"
Säule: Glaskapillarsäule OV 101, 25 m, weitere Bedingungen s. unter III.B.3

5.2 Strukturbestimmung des Hemmstoffs

5.2.1 Bestimmung des Molekulargewichts und der Elementarzusammensetzung

Der Typus des Massenspektrums, das mittels GC/MS sowohl der aktiven Fraktion 70 (s.Abb.15,S.93) als auch der gereinigten Hemmfraktionen (s.Abb.18,S.98) erhalten wurde, weist auf einen Carbonsäureester hin (s.Abb.19a, S.100). Man findet die für Carbonsäureester typischen Schlüsselbruchstücke m/e 59 für $[COOCH_3]^+$ und m/e 74. Das Fragment m/e 59 entsteht durch homolytische Spaltung der Bindung zwischen der Carbonylgruppe und dem Rest $R^{\cdot}$ (α-Spaltung). Die Bildung des McLafferty - Produktes m/e 74 ist nur bei Estern, die ein zur Carboxylgruppe γ-ständiges H - Atom besitzen, energetisch begünstigt. Auf Grund der Art der Aufarbeitung, des IR - Spektrums (s.Abb.11,S.75) und v.a. einer gaschromatographischen Analyse der Fraktion 70 unter Verwendung eines für N - Verbindungen spezifischen Detektors, mit dem der Inhibitor nicht angezeigt wurde, kann die Anwesenheit von Stickstoff ausgeschlossen werden. Nach Trimethylsilylierung der Probe blieben Retentionszeit und Massenspektrum unverändert, während z.B. die tertiäre OH - Gruppe des Citronensäuretrimethylesters unter den gleichen Bedingungen vollständig derivatisiert wurde. Das Molkül enthält also keine freie OH - Gruppe und das Vorliegen einer Hydroxycarbonsäure ist daher auszuschließen.
Verbindungen, die sich nur aus C, H und O zusammensetzen, können nur geradzahlige Molekulargewichte besitzen. Da der Hemmstoff, wie oben gezeigt, keinen Stickstoff ent-

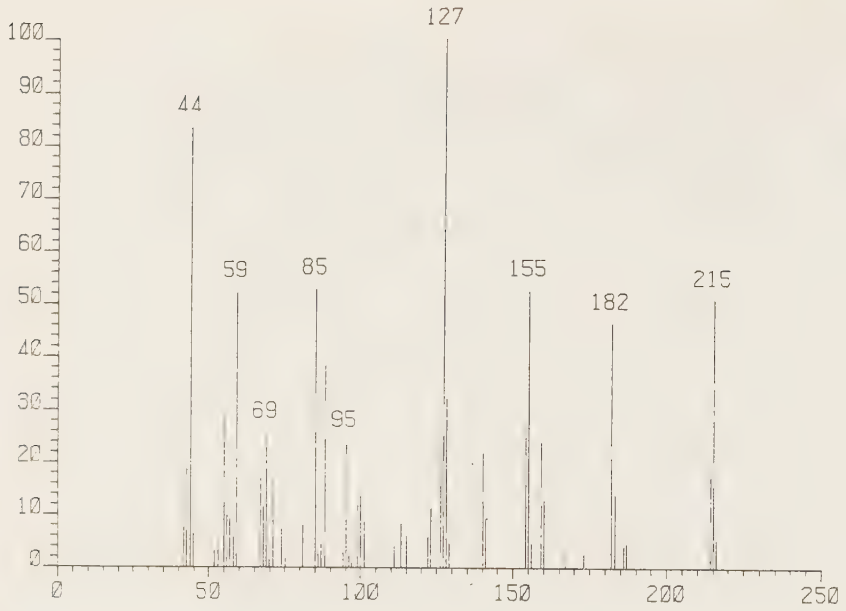


Abb.19a: Massenspektrum des Hemmstoffs "RT 29.5"

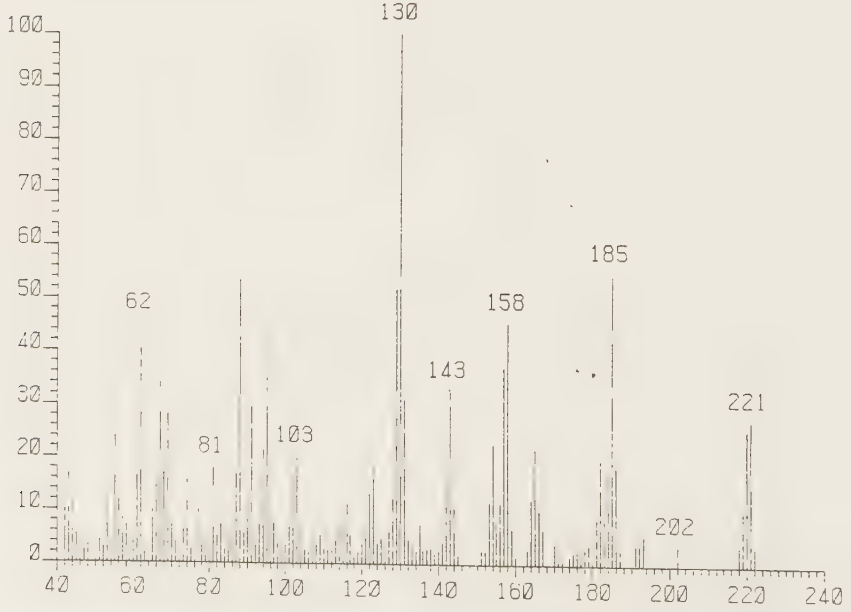


Abb.19b: Massenspektrum des Hemmstoffs "RT 29.5" nach Deuteriummarkierung

hält, kann es sich bei dem ersten intensiven Signal m/e 215 nicht um den Molekülpeak handeln. Wie aus den Massenspektren der in Tab.7 (S.89) aufgeführten Verbindungen zu ersehen ist, weisen Polycarbonsäuremethylester kein M^+ auf. Je nach Struktur beobachtet man $M^+-[OCH_3]^\cdot$ oder $M^+-[COOCH_3]^\cdot$. Für den Hemmstoff ergibt sich daraus entweder das Molekulargewicht 246 (215+ $[OCH_3]^\cdot$) oder MG 274 (215+$[COOCH_3]^\cdot$). Unter dieser Annahme und der mehrfach beobachteten Abspaltung von OCH_3,CH_3OH, $HCOOCH_3$ und $COOCH_3$ müßte sowohl mit MG 246 als auch mit MG 274 entweder ein Methoxydicarbonsäuredimethylester oder ein Tricarbonsäuretrimethylester vorliegen:

MG 246

a_1) Tricarbonsäuretrimethylester

$C_{11}H_{18}O_6 - [OCH_3] \longrightarrow C_{10}H_{15}O_5$ (215)

a_2) Methoxydicarbonsäuredimethylester

$C_{12}H_{22}O_5 - [OCH_3] \longrightarrow C_{11}H_{19}O_4$ (215)

MG 274

b_1) Tricarbonsäuretrimethylester

$C_{13}H_{22}O_6 - [COOCH_3] \longrightarrow C_{11}H_{19}O_4$ (215)

b_2) Methoxydicarbonsäuredimethylester

$C_{14}H_{26}O_5 - [COOCH_3] \longrightarrow C_{12}H_{23}O_3$ (215)

Die Möglichkeit b_1) ist unwahrscheinlich, da bei Tricarbonsäureestern ohne Hydroxy- oder Methoxysubstitution in α-Stellung die Abspaltung von $M^+-[COOCH_3]$ nicht bevorzugt auftritt, sie wird aber trotzdem in diese Betrachtung mit einbezogen. Zur Unterscheidung zwischen den 4 Möglichkeiten wurde ein hochauflösendes Massenspektrum des Hemmstoffs aufgenommen (s.Tab.8,S.102).

Tab.8: Hochauflösendes Massenspektrum des Hemmstoffs " RT 29.5 " und m/e - Werte des Massenspektrums der deuterierten Verbindung

m/e	C H O	genaue Masse	Fehler-grenze	m/e der deuterierten Verb.
215	$C_{10}H_{15}O_5$	215.0898	2.1	221
182	$C_9H_{10}O_4$	182.0569	1.08	185
173	$C_8H_{13}O_4$	173.0765	4.8	179
160	$C_7H_{12}O_4$	160.0727	0.8	166
159	$C_7H_{11}O_4$	159.0653	0.4	165
155	$C_8H_{11}O_3$	155.0699	0.9	158
154	$C_8H_{10}O_3$	154.0635	-0.5	157
140	$C_7H_8O_3$	140.0410	6.3	143
128	$C_6H_8O_3$	128.0455	1.8	131
127	$C_7H_{11}O_2$	127.0756	0.3	130
127	$C_6H_7O_3$	127.0386	0.9	130
126	$C_7H_{10}O_2$	126.0668	1.3	129
123	$C_7H_7O_2$	123.0416	3.0	126
101	$C_5H_9O_2$	101.0671	-6.9	104
100	$C_5H_8O_2$	100.0526	-0.2	103
95	C_6H_7O	95.0459	3.8	95
88	$C_4H_8O_2$	88.0498	2.6	91
85	C_5H_9O	85.0645	0.9	88
71	C_4H_7O	71.0494	0.2	71
69	C_4H_5O	69.0408	-6.7	69
67	C_5H_7	67.0553	-0.5	67
59	$C_2H_3O_2$	59.0154	-2.1	62
55	C_3H_3O	55.0188	-0.4	55
55	C_4H_7	55.0511	3.6	55

Wie aus Tab.8 (S.102) zu ersehen ist, wurde durch die hochauflösende MS für das Ion m/e 215 eine Elementarzusammensetzung von $C_{10}H_{15}O_5$ ermittelt. Daher kann es sich bei dem Inhibitor nur um einen Tricarbonsäuretrimethylester der Summenformel $\underline{C_{11}H_{18}O_6}$ (Möglichkeit $\underline{a}_1$) handeln. Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurde die aktive Fraktion $\underline{A}$ der Chromatographie an Sephadex (vgl.IV. 2.2.2) mit Deuterodiazomethan methyliert, nachdem vorher die aktiven Wasserstoffatome der Säure durch mehrmaliges Auflösen der Probe in CD_3OD und anschließendes Eindampfen ausgetauscht wurden (massenspektrometrische Zerewitinoff - Bestimmung). Auf Grund der kurzen Einwirkzeit des Deuterodiazomethans (Entfernung von überschüssigem Reagenz nach beendeter Stickstoffentwicklung) war gewährleistet, daß nur Carboxylgruppen verestert, eventuell vorhandene OH - Gruppen jedoch nicht angegriffen wurden. Nach der Deuterierung wurde die Probe wie beschrieben gereinigt, der Hemmstoff isoliert und von dem deuterierten Ester ein Massenspektrum aufgenommen (s.Abb.19b, S.100). Die m/e - Werte des deuterierten im Gegensatz zum nicht deuterierten Hemmstoff sind in Tab.8, (S.102) dargestellt. Folgende Verschiebungen zu größeren Massen sollten bei den vorher angeführten Möglichkeiten $\underline{a}_1$) und $\underline{a}_2$) erwartet werden:

a_1) Tricarbonsäuretrimethylester $C_{11}H_{18}O_6$

$C_{11}H_{18}O_6 \rightarrow C_{11}H_9D_9O_6 - [OCD_3] \rightarrow C_{10}H_9D_6O_5$

(MG 246) (MG 255) (MG 221)

a_2) Methoxydicarbonsäuredimethylester $C_{12}H_{22}O_5$

$C_{12}H_{22}O_5 \rightarrow C_{12}H_{16}D_6O_5 - [OCD_3] \rightarrow C_{11}H_{16}D_3O_4$

(MG 246) (MG 252) (MG 218)

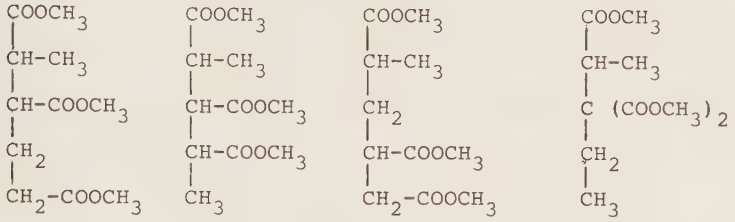
Tatsächlich wird nach der Methylierung mit Deuterodiazomethan das Signal m/e 215 zu m/e 221 verschoben (vgl. Abb. 19b, S. 100; Tab. 8).Die Behandlung des Hemmstoffs mit Deuterodiazomethan lieferte also einen zusätzlichen Beweis für das Vorliegen eines Tricarbonsäuretrimethylesters.

.2 Formulierung von 8 möglichen Tricarbonsäuretrimethylestern

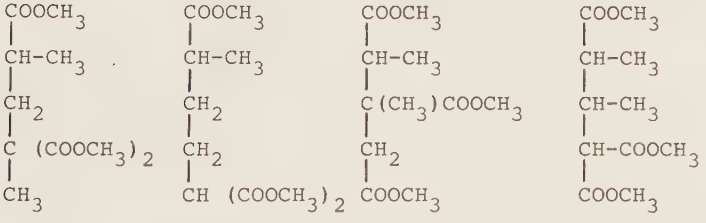
Einen wertvollen Hinweis erhält man durch das Signal m/e 88 und das Ion m/e 159 (M^+- 87). Diese Schlüsselbruchstücke weisen auf das Strukturelement eines α-Methyl-Carbonsäureesters hin. Das Signal m/e 88 tritt z.B. in dem Spektrum von 2,4-Dimethyladipinsäuredimethylester als stabilstes Ion auf (vergl.[93) Spiteller, 1979] Nr. 52). Es fehlen die sonst für Ester typischen Fragmente m/e 60 und m/e 61, die auch im Massenspektrum des Hemmstoffs nicht beobachtet werden. Wenn bei unverzweigten Carbonsäureestern die Carbonylgruppe an eine Alkylkette mit drei oder mehr Kohlenstoffatome gebunden ist, und sich am γ - C - Atom ein Wasserstoff befindet, so erfolgt nach McLafferty - Umlagerung eine β - Spaltung und man findet das Fragment m/e 74 für $[\ R\text{-}HC{=}\underset{\underset{OH}{|}}{C}\text{-}OCH_3\ ]^+$; dabei ist R = H.
Im Falle der methylverzweigten Carbonsäureester ist das McLafferty - Produkt um 14 ME schwerer und man erhält, wie bei dem vorliegenden Molekül, m/e 88. Umlagerungsprodukte dieses Typs sind leicht zu erkennen, da sie geradzahlige m/e - Werte besitzen. Auf Grund der erfolgten McLafferty - Umlagerung muß der Hemm-

stoff neben der Methylverzweigung in α - Stellung zu einer Carboxylgruppe eine Alkylkette mit mindestens 3 C - Atomen enthalten.

Aus den bisher aus dem Massenspektren des Inhibitors " RT 29.5 " gewonnenen Daten lassen sich acht mögliche isomere Tricarbonsäuretrimethylester formulieren:



I II III IV



V VI VII VIII

Es handelt sich bei den dargestellten Verbindungen um isomere Pentantricarbonsäuretrimethylester.

5.2.3 Struktur des Hemmstoffs " RT 29.5 "

Aus den im folgenden geschilderten MS - Untersuchungen (Abb. 19/20; Tab. 8) ist für den Hemmstoff die Struktur eines 1,3,4-Pentantricarbonsäuretrimethylesters (I) als sehr wahrscheinlich abzuleiten.

Das Fragmentierungsschema des Hemmstoffs ist in Abb. 20 (S. 106) dargestellt.

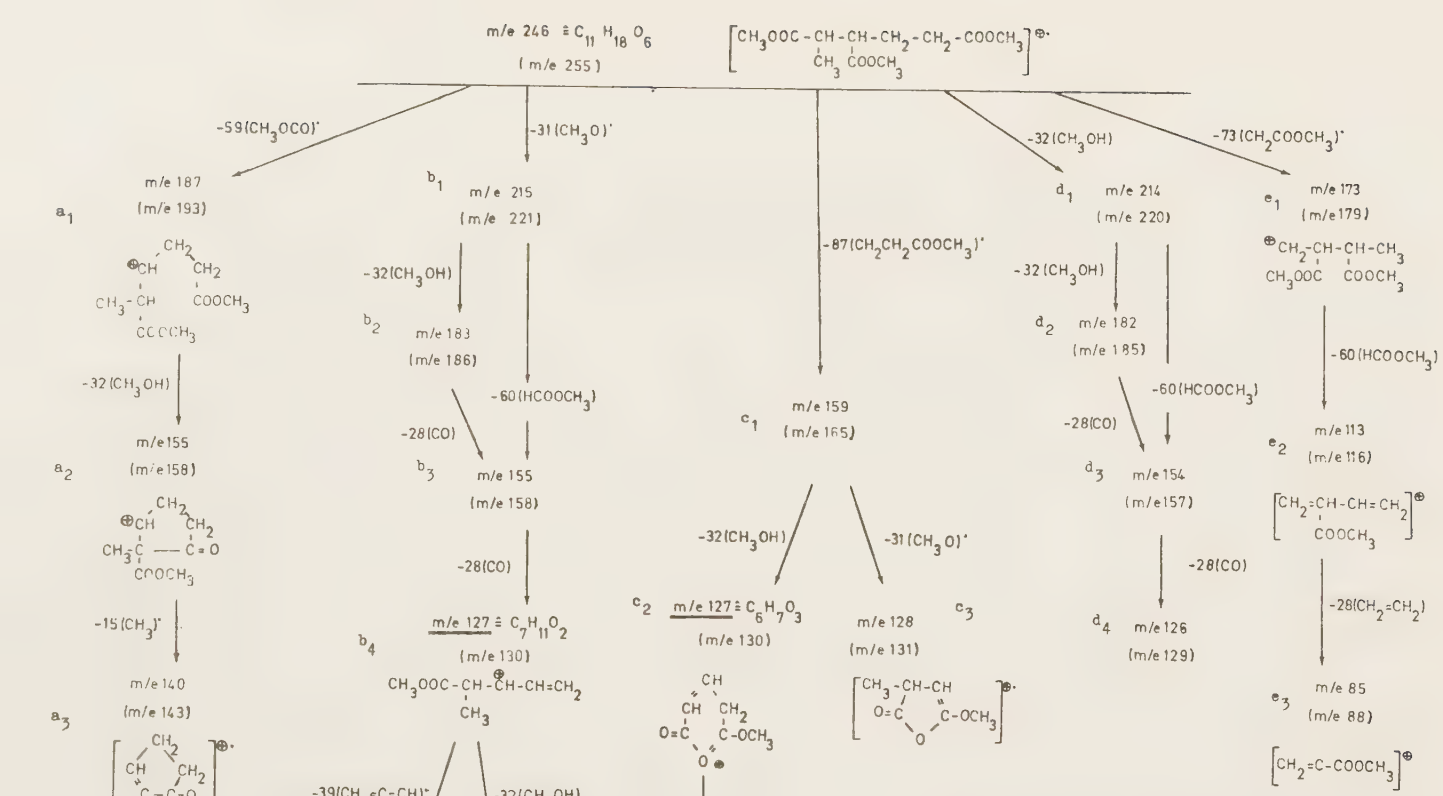


Abb.20: MS - Fragmentierung des Hemmstoffs "RT 29.5". Die in ( ) aufgeführten m/e - Werte sind dem Spektrum der deuterierten Verbindung entnommen. Die Summenformeln wurden mittels hochauflösender Massenspektrosko-

Das Fragmentierungsschema stützt sich auf energetische Betrachtungen, auf die Bestimmung der Elementarzusammensetzung der meisten Ionen mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie und auf die Verschiebung der Ionenmassen nach Deuteriummarkierung mit Deuterodiazomethan. Die diskutierten Übergänge sind bisher nicht durch spezielle Meßtechniken (metastabile Ionen etc.) gesichert.

Ausgehend vom Molekülion bei m/e 246 stehen die Abspaltungen von 59 ME (→ 187/193), 31 ME (→ 215/221) und Methanol (- 32 ME) (→ 214/220), von 87 ME (→ 159/165) und 73 ME (→ 173/179) mit der angenommenen Struktur im Einklang.

Der Verlust von 59 ME führt zum Ion $\underline{a}_1$ (m/e 187), das sich durch den Verlust von Methanol (→ $\underline{a}_2$, m/e 155) und nachfolgende Abspaltung einer Methylgruppe (→ $\underline{a}_3$, m/e 140) und einer weiteren Methoxycarbonylgruppe zum Ion $\underline{a}_4$ der Masse m/e 81 stabilisiert. Das Ion $\underline{b}_1$ (m/e 215) kann sich durch Abspaltung von Methanol, Ameisensäure und CO zum intensivsten Ion des Spektrums, $\underline{b}_4$ (m/e 127, $C_7H_{11}O_2$) stabilisieren. Ein Fragment $\underline{c}_2$ der Masse 127 kann auch aus dem Molekülion durch Abspaltung der Propionsäureesterseitenkette und nachfolgender Eliminierung von Methanol entstehen. Die für diese Fragmentierung zu fordernde Elementarzusammensetzung wird durch die Verschiebung zu m/e 130 nach Deuteriummarkierung bestätigt.

Wie bei den meisten bisher untersuchten Estern dieses Typs wird auch hier die Abspaltung von Methanol aus M^+ zu $\underline{d}_1$ (m/e 214) beobachtet.

Dabei soll ein aktiviertes C_6-H-Atom mit der Methoxygruppe der Esterfunktion eliminiert werden [101) Budzikiewicz, 1964]. Das Fragment $\underline{d}_2$ (m/e 182) entsteht durch den Verlust eines weiteren Moleküls Methanol aus m/e 214. Durch Eliminierung von Ameisensäuremethylester aus m/e 215 bzw. 214 läßt sich das Signal $\underline{b}_3$ (m/e 155) bzw. $\underline{d}_3$ (m/e 154) erklären.

Nach dem Verlust von CD_3OH beträgt die Massendifferenz des Signals m/e 185 der deuterierten Probe noch 3 ME. Da diese Massendifferenz auch noch bei dem Fragment m/e 158 beobachtet wird, bestätigt sich, daß m/e 158 durch Abspaltung von $HCOOCD_3$ aus m/e 221 hervorgegangen ist.

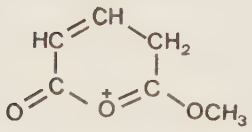
Wie bereits ausgeführt, sind im unteren Bereich des Spektrums die aus einer McLafferty - Umlagerung entstandenen Radikalkationen bei m/e 74 und m/e 88 für die Strukturaufklärung von großer Bedeutung, da sie beweisend für einen geradkettigen Carbonsäureester bzw. einen α-Methylcarbonsäureester mit einem Wasserstoff am γ-C-Atom sind. Beide Strukturelemente sind im Hemmstoffmolekül vorhanden. Die Anwesenheit dieser Strukturelemente wird zusätzlich gesichert durch die oben beschriebene Abspaltung von 73 ME ($\rightarrow \underline{e}_1$) und 87 ME ($\rightarrow \underline{c}_1$).

Wie durch das Fragmentierungsschema gezeigt wurde, läßt sich jedes Ion im Massenspektrum des Hemmstoffs, im Gegensatz zu den Isomeren II - VIII, mit der Struktur des 1,3,4-Pentantricarbonsäuretrimethylesters (I) vereinbaren. Im folgenden werden die Gründe, die gegen die Strukturen II - VIII sprechen, diskutiert.

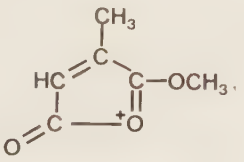
Die Isomeren IV, V, VI und VIII können gemeinsam abgehandelt werden, da alle das Strukturelement eines Malonsäuredimethylesters aufweisen. Nach Abspaltung dieser Malonestergruppierung sollte des Fragment m/e 131 erwartet werden, das aber im Massenspektrum des Inhibitors nicht beobachtet wird. Daneben sollte man bei V auf Grund der im Molekül vorhandenen Methylmalonestergruppierung noch m/e 145 finden. Bei den genannten Isomeren läßt sich das Auftreten des Signals $M^+ - 73$ (→ m/e 173), das durch Eliminierung von $[CH_2\text{-}COOCH_3]^\cdot$ aus dem Molekülion entsteht, nicht erklären. Diese Fragmentierung ist nur möglich, wenn sich in Nachbarstellung zu einer Carboxylfunktion eine unsubstituierte Methylengruppe befindet, die an ein sekundäres oder tertiäres C - Atom gebunden sein sollte, da die Fragmentierung bevorzugt an den Stellen größter Verzweigung eintritt. Diese Voraussetzungen werden lediglich, neben I, von den Isomeren III und VII erfüllt. Aus dem gleichen Grunde ist eine McLafferty - Umlagerung und die Bildung von m/e 74 nur bei III und VII, nicht aber bei den übrigen, hier diskutierten Isomeren begünstigt. Das Fragment m/e 74 wird weder bei Verbindungen, die keine unsubstituierte Methylengruppe in α - Stellung zu einer Carboxylfunktion enthalten, noch bei Verbindungen, bei denen 2 Carboxylfunktionen an ein C- - Atom gebunden sind, beobachtet. IV enthält eine isolierte Äthylgruppe, die, wie z.B. bei Äthylmalonsäuredimethylester, bevorzugt abgespalten wird. Im Massenspektrum dieser Verbindung sollte daher das Signal $M^+ - 28$ (→ m/e 218) erwartet werden.

Zwei Punkte, die gegen Struktur II bzw. III sprechen, wurden oben bereits angeführt. Diese Isomeren enthalten das Strukturelement eines Bernsteinsäuredimethylesters. Durch Bindungsbruch zwischen dem Dicarbonsäureesterteil und dem Rest R sollte ein Ion der Masse 145 auftreten, was im Massenspektrum des Hemmstoffs, wie bereits erwähnt, nicht der Fall ist. Das Fragment m/e 145 stabilisiert sich unter Verlust von 30 ME zu dem Ion m/e 115, das z.B. im Massenspektrum des aus Flughafer isolierten 1,2,3-Propantricarbonsäuretrimethylesters als stabilstes Ion gefunden wird.
Lediglich die Struktur des Isomeren VII läßt sich weitgehend mit der beobachteten Fragmentierung vereinbaren. VII erscheint aber auf Grund energetischer Betrachtungen ebenfalls unwahrscheinlich.
Das Fragment m/e 127, das den Basepeak im Massenspektrum des Inhibitors darstellt, entsteht einmal durch Verlust eines Methoxyradikals aus dem Molekülion ($\rightarrow$ 215) mit nachfolgender Eliminierung von Ameisensäure ($\rightarrow$ 155) und C$\equiv$O ($\rightarrow$ 127). Es kann aber noch über einen zweiten Weg entstehen, der der Abspaltung der Propionsäureestergruppierung aus M^+ zu m/e 159 und anschließendem Verlust von Methanol entspricht. Wie aus dem hochaufgelösten Massenspektrum zu ersehen ist, setzt sich m/e 127 tatsächlich aus zwei Ionen verschiedener Zusammensetzung zusammen, $C_7H_{11}O_2$ und $C_6H_7O_3$.
Bei dem Fragment der Summenformel $C_6H_7O_3$ läßt sich ein energetisch günstiges 6 - Ringsystem (a) formulieren, das die Stabilität des Ions erklärt. Analog gelangt man bei VII (und bei II) ebenfalls zu m/e 127.

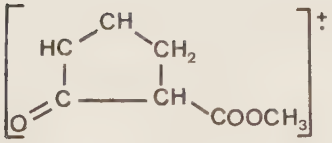
Auf Grund der zusätzlichen Methylverzweigung ist aber nur die Bildung eines 5 - Ringkations (b) möglich, das im Vergleich zu (a) eine etwas erhöhte Ringspannung aufweist.



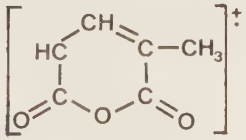
(a)



(b)



(c)



(d)

Abb. 21: Mögliche Strukturformeln der Bruchstücke m/e 127 und 140.

Das Fragment m/e 140 läßt sich bei I als cyclisches Radikalkation formulieren (c). Die erwartete Abspaltung der am 5 - Ring gebundenen Carbomethoxygruppe zu m/e 81 wird im Massenspektrum des Inhibitors mit einer relativen Intensität von 11 % gefunden. Bei der Verbindung VII ist nach Eliminierung von Methanol aus m/e 187 die Ausbildung eines 6 - Ringes der Masse 155 energetisch bevorzugt. Durch Abspaltung eines Methylradikals aus der Methoxygruppe erhält man das Radikalkation

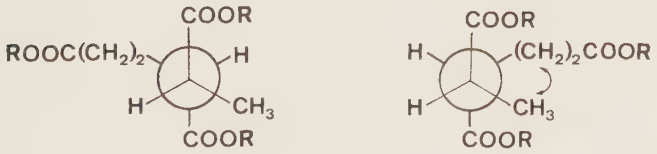
m/e 140, das sich in Form eines 6 - Ring - Anhydrids darstellen läßt (d). Als Folgereaktion sollte man den weiteren Verlust von C≡O zu m/e 112 erwarten. Das Signal der Masse 112 tritt aber im Massenspektrum des Hemmstoffs nicht auf.

Aus der Interpretation des Massenspektrums des Hemmstoffs " RT 29.5 " geht hervor, daß die Verbindung I die größte Übereinstimmung mit der beobachteten Fragmentierung aufweist. Um die Struktur sicherzustellen, wurde I daher synthetisch hergestellt.

5.3 Vergleich der spektroskopischen Daten und der Bioaktivität des Hemmstoffs " RT 29.5 " und eines synthetisierten 1,3,4-Pentantricarbonsäuretrimethylesters

Der systematische Name der Verbindung I ist 1,3,4--Pentantricarbonsäuretrimethylester (ohne Berücksichtigung der Stereoisomerie). Dieser Ester wird in der Literatur im Zusammenhang mit der Konstitutionsaufklärung von Chlorophyllen und Gallenfarbstoffen beschrieben [102) Fischer,1939; 103) Ficken, 1956; 104)-106) Brockmann jr., 1968/69/71; 112) Golden,1958]. Während beim Abbau von Alkaloiden [107) Apsimon, 1963], mikrobiellen Stoffwechselprodukten [113) Brown, 1970] und Terpenen [108) Henry, 1928] vornehmlich 2-Mono- und 2,2-Dialkylbernsteinsäure erhalten werden, wird beim Chromsäureabbau z.B. von Bakteriochlorophyll a unter Aufbrechen des Makrocyclus der Ring II zu einer (+)-2-Methyl-3-äthylbernsteinsäure und Ring IV zu einer (-)-2-Methyl-3-carboxyäthylbernsteinsäure (= 1,3,4--Pentantricarbonsäure) oxidiert [109 Bode, 1972].

Die 1,3,4-Pentantricarbonsäure ist auch allgemein unter dem Trivialnamen Dihydrohämatinsäure bekannt. Sie wurde aber bisher noch nicht, soweit bekannt, als natürlich in grünen Pflanzen vorkommend gefunden bzw. isoliert, also auch nicht auf eine biologische Wirkung hin überprüft. Das gleiche gilt für den Ester. Das Molekül enthält 2 asymmetrische C - Atome, und man unterscheidet 4 Stereoisomere: Erythro- und threo-Formen, jeweils in zwei Enantiomerenpaaren. Dabei zeichnet sich die erythro - Form durch eine im Vergleich zur threo - Form erhöhte Stabilität aus [109) Bode, 1972]. Die thermodynamische Bevorzugung der erythro - Form wird verständlich, wenn man beide Stereoisomere in der Newman - Projektion betrachtet:



(a) (4R, 3S)-erythro (b) (4R, 3R)-threo

Abb.22: Newman - Projektionen der erythro- und threo - Formen der Dihydrohämatinsäure

Bei einer antiperiplanaren Einstellung der ROOC - Gruppen stehen nur bei der erythro - Form die voluminösen Reste gleichzeitig ebenfalls antiperiplanar zueinander (s. Pfeil in Abb.22).

Zur Darstellung des Dihydrohämatinsäureesters wurde Hämatinsäureanhydrid zur Hydrolyse der Anhydridbindung in Methanol gelöst und anschließend mit Diazomethan methyliert. Zum Nachweis der Umsetzung wurde ein IR - Spektrum aufgenommen (ohne Abb.). Es zeigte sich, daß die Methylierung mit Diazomethan bei Raumtemperatur glatt verlief, während bei Verwendung von Methanol/H_2SO_4 im Gegensatz zu Bernsteinsäureanhydrid und Itaconsäureanhydrid eine Veresterung erst nach Erhitzen erfolgte.
Das Massenspektrum des Hämatinsäuretrimethylesters liefert als erstes Signal m/e 213 für M^+- 31 (ohne Abb.). Eine für ungesättigte Ester charakteristische Fragmentierung stellt die bevorzugte Eliminierung von Methanol aus dem Molkülion dar, die die hohe Intensität (94%) des Signals m/e 212 für M^+- 32 erklärt (vergl.[93) Spiteller, 1979] Nr.34, 164). Als weitere Schlüsselionen werden m/e 180 (m/e 212 - MeOH), der basepeak m/e 153 (m/e 212 - $[COOCH_3]^\cdot$), sowie m/e 125 (m/e 153 - C≡O) und m/e 93 (m/e 153 - $HCOOCH_3$) beobachtet.
Der Hämatinsäuretrimethylester wurde mit PtO_2/H_2 30 Stunden bei Raumtemperatur und Normaldruck hydriert (nach [111) Knobloch, 1972]). Die anschließend durchgeführte Trennung ergab, daß ausschließlich der gesättigte Ester vorlag. Dieser wurde gaschromatographisch, massenspektrometrisch und im Biotest mit dem Hemmstoff "RT 29.5" verglichen.
Das Massenspektrum des synthetischen Produktes ist identisch mit dem des Naturstoffes, d.h. der Hemmstoff "RT 29.5" besitzt mindestens die gleiche Konstitution (vergl. Abb.19a, S.100 und Abb.23b, S.115).

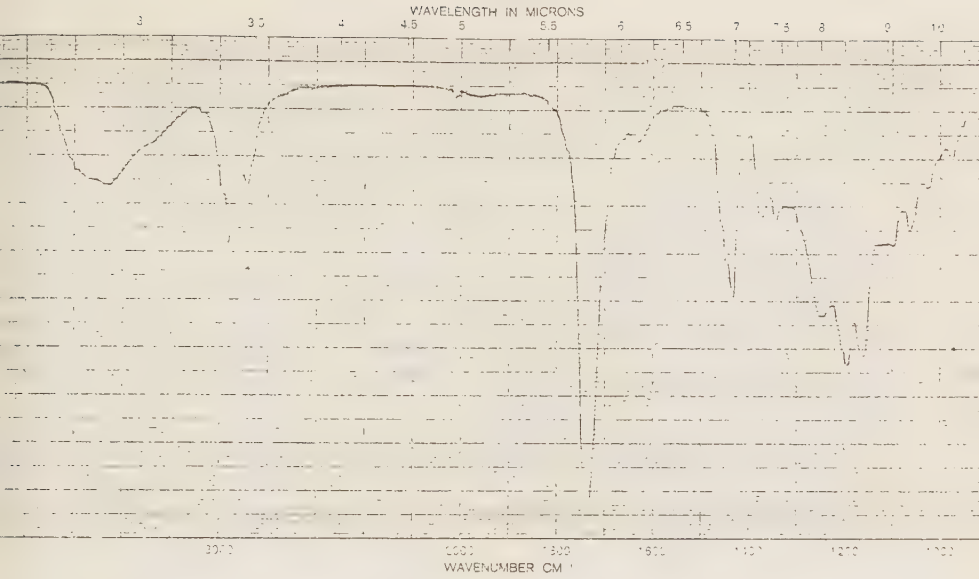


Abb.23a: IR - Spektrum des synth. Dihydrohämatinsäuretrimethylesters

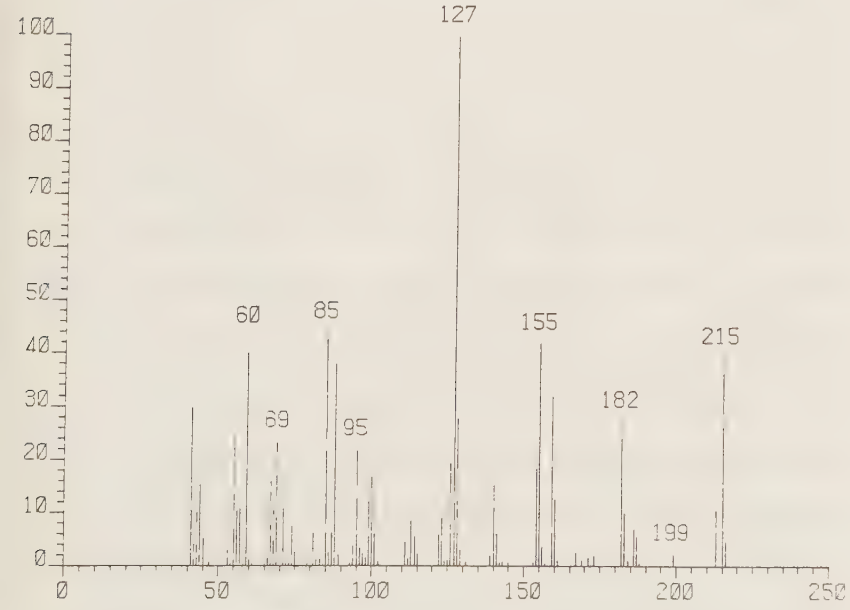


Abb.23b: Massenspektrum des synth. Dihydrohämatisäuretrimethylesters

Tab.9: Hemmwirkung synthetischer, substituierter Bernsteinsäuredimethylester im Biotest mit Amaranthus caudatus

Verbindung	% Hemmung	
	1×10^{-4}M	1×10^{-5}M
Dihydrohämatinsäuretrimethylester	100	54
Hämatinsäuretrimethylester	58	36.5
2-Äthyl-3-Carbomethoxybernsteinsäure dimethylester	57.5	44.8
2-Methyl-3-Carbomethoxybernsteinsäuredimethylester	0	0

Als weitere Bestätigung der ermittelten Struktur des Hemmstoffs diente der Biotest mit Amaranthus caudatus (s.Tab.9).Neben dem v.a. interessierenden Dihydrohämatinsäuretrimethylester wurden auch die ungesättigte Verbindung und zwei weitere, in Tab.9 aufgeführte, substituierte Bernsteinsäuredimethylester auf keimungshemmende Wirkung geprüft. Erwartungsgemäß zeigte der gesättigte Ester gegenüber der Verbindung, die noch eine Doppelbindung enthält, eine höhere Bioaktivität. In einer Konzentration von 1×10^{-4}M wurde die Keimung des Testsaatguts völlig, von einer 1×10^{-5}M Lösung zu 54 % unterdrückt. Die aus Haferspelzen isolierte

Dihydrohämatinsäure bewirkte in Form des Trimethylesters in einer Konzentration von 1 x 10^{-5}M eine vollständige Keimungshemmung von Amaranthus caudatus und hemmte das Wachstum der Keimwurzeln und Koleoptilen von A. sativa zu 80 % (2 x 10^{-5}M: 98 %, Mittelwerte der Wachstumshemmung der Keimwurzeln und Koleoptilen von A. sativa). Dieser Unterschied in den Bioaktivitäten der synthetischen und der natürlichen Verbindung weist darauf hin, daß möglicherweise nur ein Isomeres die Inhibitorwirkung zeigt bzw. wirksamer ist als die übrigen Stereoisomeren. Bei der Koinjektion des synthetischen Esters und der aus dem Pflanzenmaterial isolierten und anschließend veresterten Dihydrohämatinsäure in den Gaschromatographen wurden sowohl auf einer OV 1 - Säule als auch auf einer FFAP - Säule zwei Peaks mit nur wenig verschiedenen Retentionszeiten erhälten. Bei der Trennung an der OV 1 - Säule entspricht der erste Peak mit der Retentionszeit 26.7 min (Säulentemperatur: 144°C) dem synthetischen, der zweite Peak mit der Retentionszeit 27.3 min. (146°C) dem Naturprodukt. (Die gegenüber den vorher durchgeführten Trennungen beobachteten Verschiebungen zu kleineren Retentionszeiten sind auf die Verkürzung der OV 1-Säule von 25 auf 20 m zurückzuführen; vergl. Abb.13, S.87; Abb.18, S.98). Beide Verbindungen weisen ein identisches Massenspektrum auf; es muß sich also um Diastereomere handeln. Durch einstündiges Einwirken von Na - Methylat ließ sich das synthetische Produkt teilweise in das natürliche umwandeln. Die gaschroma-

tographische Trennung zeigte, daß beide Isomeren im Verhältnis 1:1 vorlagen. Als Beweis dafür, daß keine unerwünschten chemischen Reaktionen erfolgten, diente wieder die Massenspektrometrie: Nach der Behandlung mit Methylat blieben die Massenspektren unverändert. Weiterhin wurde Dihydrohämatinsäure nach der Vorschrift von Gray und Nicholson [132) 1958] dargestellt. Nach der Hydrolyse des Cyanesters sollen sich die Diastereomeren durch fraktionierte Kristallisation aus wässriger HCl trennen lassen. Es zeigte sich jedoch, daß lediglich die leichter kristallisierende erythro - neben Spuren der threo - Form erhalten wurde. Nach Methylierung wies der erythro - Dihydrohämatinsäuretrimethylester eine Retentionszeit von 26.7 min auf. Daher muß es sich bei der natürlichen Verbindung um die threo - Form, die auch nach Chromsäureabbau von Chlorophyllen erhalten wird, handeln.

6. Nachweis von keimungshemmenden Substanzen in den Spelzen von Saathafer (A. sativa), der sich im Stadium der sekundären Keimruhe befindet.

Bisher konnte gezeigt werden, daß die Spelzen von A. sativa einen Keimungsinhibitor enthalten, der als Dihydrohämatinsäuretrimethylester identifiziert wurde. Bei exogener Applikation weisen sowohl das natürliche als auch das synthetische Produkt in niedrigen Konzentrationen (ca. 1×10^{-5}M) bei Samen von A. sativa und Amaranthus caudatus eine keimungsinhibierende Wirkung auf. Dabei werden die Samen nicht irreversibel

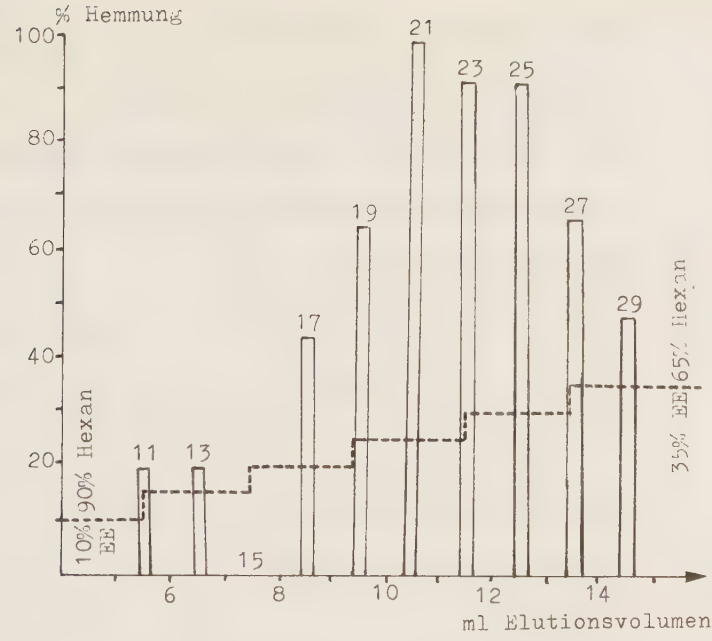
geschädigt; nach mehrstündigem Auslaugen des Hemmstoffs durch Überführen des Testsaatguts aus der Hemmstofflösung in bidest. H_2O keimen die Samen normal aus. Es wurde daher geschlossen, daß Dihydrohämatinsäure bzw. ihr Ester eine Rolle bei der Keimruhe von A. sativa spielt und spezifisch in den Spelzen von Saathafer, der sich gerade im Stadium der sekundären Keimruhe befindet, nachgewiesen werden kann. Wie eingangs erwähnt, verfallen die Samen von A. sativa direkt nach der Reifung in Keimruhe, die sich über mehrere Monate erstreckt. Daher wurden für die folgenden Untersuchungen frisch geerntete Samen verwandt (Ernte 1980), bei denen gewährleistet war, daß die Keimruhe noch nicht auf Grund einer mehrmonatigen Lagerung aufgehoben wurde.

6.1 Isolierung und Identifizierung des Dihydrohämatinsäuretrimethylesters

Die Samen wurden wie unter III.A.1.1b beschrieben entspelzt, 100 g grob zerkleinerte Spelzen dem bekannten Aufarbeitungsverfahren unterworfen (vergl. III.A.11) und der Ätherextrakt, erhalten nach Hydrolyse der wässrigen Phase mit NH_3, an Sephadex LH 20 aufgetrennt. Im Gegensatz zur Chromatographie eines Extraktes des Spelzengemisches an Sephadex (vergl. IV.2.2.2) wurden mit H_2O zwei aktive Hemmbereiche $\underline{A}_1$ und $\underline{A}_2$ eluiert, die durch einen inaktiven Bereich getrennt sind. Die Hemmwirkung von $\underline{A}_1$ und $\underline{A}_2$ sollte auf verschiedene Inhibitoren zurückzuführen sein. Ein zweiter aktiver Bereich trat aber ebenfalls bei der Auftrennung der pH 1 - Fraktion an Sephadex (s. IV.1.3) und bei der

Chromatographie eines Ätherextraktes aus 12 kg Haferspelzen nach Hydrolyse der wässrigen Phase mit NH_3 auf (vergl. Abb. 10, S. 73). Der Hemmbereich $\underline{A}_1$ entsprach auf Grund des benötigten Elutionsvolumen der carbonsäurehaltigen Hemmfraktion und wurde bevorzugt auf ihren Gehalt an Dihydrohämatinsäure untersucht. Die Säuren wurden in die Methylester überführt, durch Sublimation gereinigt und mittels Chromatographie an Lichroprep weiter aufgetrennt. Wie in Abb. 24 dargestellt, wurden die hemmenden Fraktionen mit Hilfe des Biotests bestimmt. Es zeigte sich, daß die Bioaktivität des aktiven Hemmbereichs $\underline{A}_1$ in Übereinstimmung mit der bereits durchgeführten Chromatographie an Lichroprep (vergl. IV.5.1 mit einem Essigester - - Anteil von 25 % (teilweise noch 30 %) am Elutionsmittelgradienten von der Säule eluiert wurde. Auf die anschließende Identifizierung des Dihydrohämatinsäureesters wird hier nur kurz eingegangen, da sie bereits ausführlich beschrieben wurde.
Bei der gaschromatographischen Trennung der Fraktionen mit keimungshemmender Wirkung stimmte die Retentionszeit eines Peaks, der in jeder aktiven Fraktion gefunden wurde und in Fraktion 21 und 22 die Hauptkomponente neben Methoxybernsteinsäuredimethylester darstellt - - auf die Schwierigkeit, den Hemmstoff von diesem Ester abzutrennen, wurde schon hingewiesen - mit der Retentionszeit des isolierten Hemmstoffs " RT 29.5 " sowie des synthetischen Produktes überein.

a) Fraktion A_1



b) Fraktion A_2

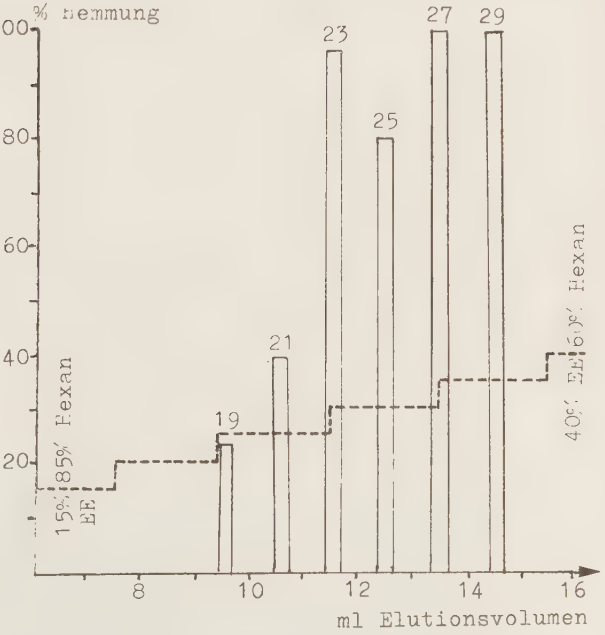


Abb.24: Lokalisierung der Hemmbereiche nach Chromatographie an Lichroprep Si 60 mittels Biotest mit Amaranthus caudatus

(--- = Stufengradient Hexan/Essigester; die Nummern über den Balken geben die Fraktionsnummern an)

Nach Koinjektion der Fraktion 21, die eine 100 %ige Hemmwirkung zeigte (vergl. Abb.24), und des Dihydrohämatinsäuretrimethylesters wurde nur ein Peak erhalten. Vor allem aber war das Massenspektrum mit dem des synthetischen Produktes bzw. des Hemmstoffs " RT 29.5 " identisch (s. Abb.23, S.115), womit bewiesen ist, daß Dihydrohämatinsäuretrimethylester (evtl. in Form der freien Säure oder des Anhydrids) auch in den Spelzen von " dormanten " Samen von Avena sativa vorliegt. Vermutlich ist er teilweise für die Keimruhe verantwortlich. Da aber mehrere Hemmfraktionen auftreten, läßt sich die Keimruhe sicherlich nicht nur auf einen Inhibitor zurückführen, sondern wird durch das Zusammenspiel mehrerer Keimungshemmstoffe hervorgerufen. Die gaschromatographisch mit Äpfelsäuredimethylester als inneren Standard (11 cm Peakhöhe ≙ 50 ng Äpfelsäuredimethylester, Abschwächung: 1 x 32) durchgeführte Bestimmung der Dihydrohämatinsäuretrimethylesterkonzentration in den Spelzen unterschiedlicher Herkunft nach verschieden langer Lagerzeit ergab bei den Spelzen von " dormanten " Samen ca. 1.3 µg/g Trokkengewicht und bei dem Spelzengemisch nach dreijähriger Lagerung 0.1 µg/g Trockengewicht. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis darauf, daß der Hemmstoff während der Lagerung abgebaut wird. Die Werte wurden aber im ersten Fall nach Aufarbeitung von 100 g Ausgangsmaterial, im zweiten nach Extraktion von 1 kg Spelzengemisch erhalten. Da die Aufarbeitung im präparativen Maßstab gleichzeitig einen größeren Verlust

an biologisch aktivem Material beinhaltet, liegt in dem Spelzengemisch vermutlich eine höhere Hemmstoffkonzentration vor. Ferner wird nach der Hydrolyse (vergl. IV.2 und IV.2.1.2) sowohl der " freie " als auch der " gebundene " Hemmstoff erfaßt. Genaue Aussagen über eine mögliche Korrelation zwischen Hemmstoffkonzentration und Länge der Keimruhe sind daher nicht möglich.

6.2 Untersuchung des Hemmbereichs $\underline{A}_2$ auf Substanzen mit keimungshemmender Wirkung

Bei der Auftrennung an Lichroprep wurde ein Unterschied im Elutionsverhalten von Dihydrohämatinsäuretrimethylester und den aktiven Substanzen des Bereichs $\underline{A}_2$ beobachtet. Während sich der Tricarbonsäureester mit einem Lösungsmittelgemisch von Hexan/Essigester = 3/1 vom Kieselgel eluieren läßt, wurde die Bioaktivität von $\underline{A}_2$ in den Fraktionen gefunden, die einen Essigesteranteil von 30 und 35 % zur Elution benötigen (vergl. Abb.24b, S.121). Zusammen mit dem unterschiedlichen chromatographischen Verhalten an Sephadex LH 20 ließ sich daraus ersehen, daß in $\underline{A}_2$ vermutlich keine Carbonsäureester vorliegen. Zur Identifizierung der für die Hemmwirkung verantwortlichen Verbindungen wurde wieder die bereits bewährte Methode der Kombination vom Biotest mit der gaschromatographischen Trennung der aktiven Fraktionen nach Chromatographie an Lichroprep verwandt. Die Korrelation der Bioaktivität mit einem Peak im GC erwies sich in diesem Falle als relativ einfach, da $\underline{A}_2$ wesentlich weniger Komponenten enthält als $\underline{A}_1$.

Wie aus Abb. 24 zu ersehen ist, beginnt die Hemmwirkung bei Fraktion 19 und erreicht sowohl in Fraktion 23 als auch in den Fraktionen 27 bis 29 den Maximalwert (100 %). In den Gaschromatogrammen der Fraktionen 25 - 30 tritt ein Peak mit der Retentionszeit 27.3 auf (≙ Säulentemperatur 146 °C), dessen Intensität proportional zur beobachteten Hemmwirkung ansteigt und in Fraktion 28 zusammen mit zwei Nebenkomponenten als Hauptkomponente enthalten ist (s. Abb. 25). Eine Verbindung der genannten Retentionszeit ließ sich dagegen in den Hemmfraktionen 19 - 24 nicht ausmachen, d.h. die hier beobachtete Keimungshemmung ist auf einen weiteren Inhibitor zurückzuführen.

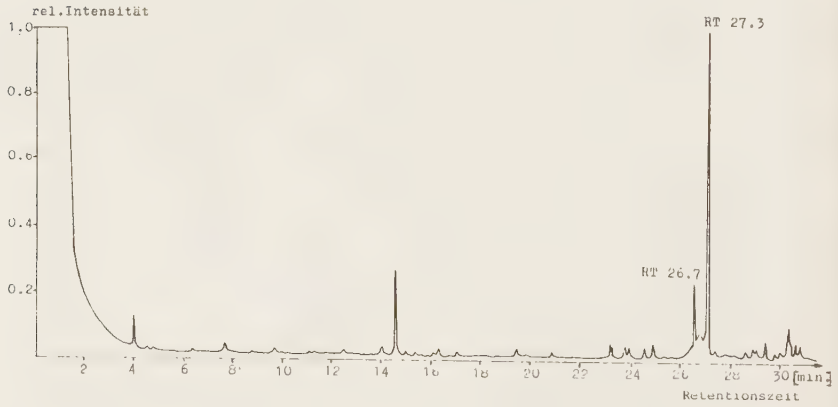


Abb.25: Gaschromatogramm der Fraktion 28, erhalten nach Chromatographie von $\underline{A}_2$ an Lichroprep. Von den Verbindungen RT 27.3 und 26.7 wurden Massenspektren aufgenommen. (Säule: Glaskapillarsäule OV 101, 20 m; Temperaturprogramm: 60 - 240 °C/ 3 °C/min.; Einspritzung: 0.5 µl; restl. Bedingungen s. unter III.B.3, S. 41)

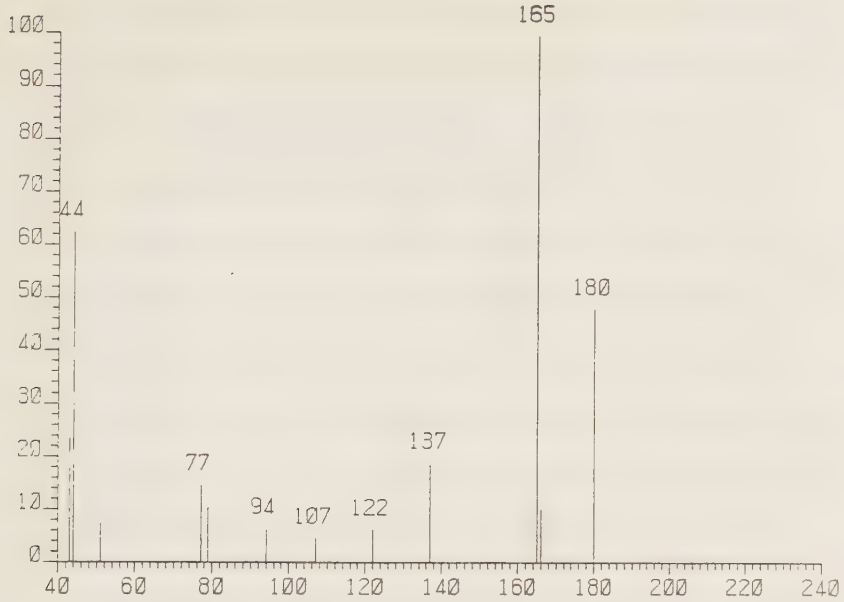


Abb.26a: Massenspektrum der Verbindung RT 26.7

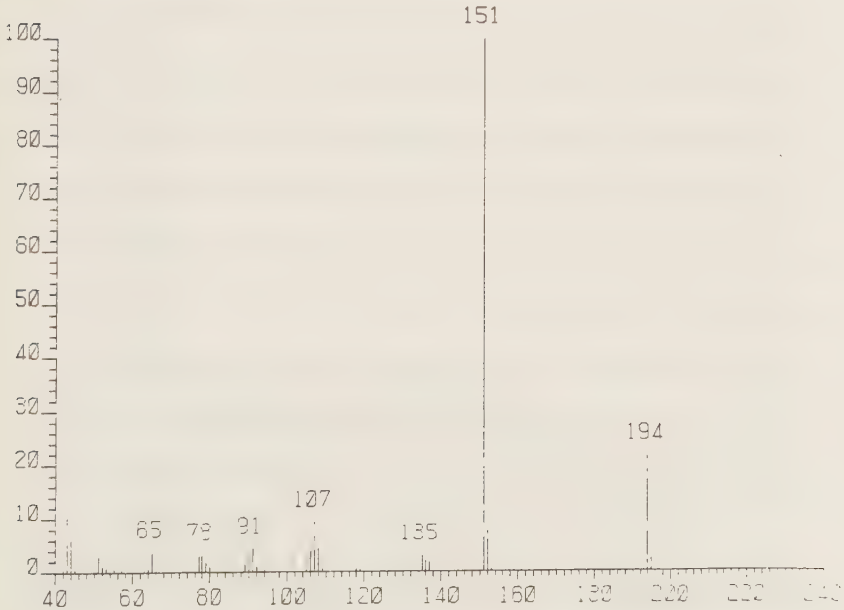


Abb.26b: Massenspektrum der Verbindung RT 27.3

Die Massenspektren der Hauptkomponente (RT 27.3) und der Nebenkomponente (RT 26.7), aufgenommen mittels GC/MS der Fraktion 28, zeigen eine für aromatische Verbindungen charakteristische Fragmentierung (Abb.26). Auf Grund der Stabilität aromatischer Systeme beobachtet man im Massenspektrum der Verbindung RT 26.7 (Nebenkomponente im Gaschromatogramm der Fraktion 28, vergl. Abb. 25) ein relativ intensives Molekülion m/e 180 (Abb. 26b). Aus dem Molekülion errechnen sich die möglichen Summenformeln $C_{10}H_{12}O_3$ oder $C_{11}H_{16}O_2$. Die Schlüsselionen m/e 51 und m/e 77 weisen auf eine aromatische Verbindung hin. Das gleichzeitige Auftreten des Signals m/e 43, das einer Acetylgruppe entspricht, läßt auf ein aromatisches Keton schließen. Aromatische Ketone zeigen einen intensiven Molekülpeak, der, wie bereits erwähnt, im Massenspektrum der vorliegenden Verbindung mit einer relativen Intensität von 50 % beobachtet wird. Durch Elimination eines Methylradikals aus m/e 180 entsteht das substituierte Benzoylkation m/e 165. Da sich Benzoylionen durch ihre außerordentliche Stabilität auszeichnen, stellt m/e 165 den Basepeak dar. Der weitere Zerfall verläuft unter Verlust von C≡O zu m/e 137.

Bei kleinen m/e - Werten ähnelt das Spektrum stark dem von Dimethoxybenzolderivaten wie Brenzcatechin- oder Hydrochinondimethyläther. Die Bruchstücke sind nur um 1 ME zu kleineren Werten verschoben,und m/e 91 wird nicht gefunden. Durch Eliminierung von $CH_3^{\cdot}$ aus m/e 137 entsteht m/e 122, als Folgereaktion tritt der Verlust von C≡O zu m/e 94 ein.

M/e 137 kann ebenfalls durch die für Methyläther von Phenolen und Naphtholen typische Abspaltung von 43 ME aus M^+ (m/e 180) entstehen. Eine Alternativreaktion zu dem beschriebenen Abbau von m/e 137 stellt der Verlust von Formaldehyd zu m/e 107 dar.
Aus dem Massenspektrum der Verbindung mit RT 26.7 ist daher die Struktur eines Dimethoxyacetophenons als sehr wahrscheinlich abzuleiten (Abb. 27b).
Zur Absicherung der ermittelten Struktur wurde ein Massenspektrum des synthetischen 3,5-Dimethoxyacetophenons* aufgenommen. Es erwies sich als identisch mit der aus Haferspelzen isolierten Substanz. Diese zeigt aber auch die gleiche Fragmentierung wie das von Spiteller in Harn nachgewiesene 3,4 - Isomere [93) 1979]. Die Position der Isomeren ist also nicht aus der MS - Fragmentierung zu bestimmen.
Im Biotest mit Amaranthus caudatus bewirkte das 3,5--Dimethoxyacetophenon in einer Konzentration von 1 x 10^{-4} M eine völlige Keimungshemmung, während unter Verwendung einer 1 x 10^{-5} M - Lösung keine Bioaktivität mehr beobachtet werden konnte. Die natürliche Verbindung liegt in den Hemmfraktionen aber nur im Verhältnis 1:5 neben der Hauptkomponente RT 27.3 vor (Abb.25) und wurde, betrachtet man z.B. Fraktion 29, die eine 100 %ige Keimungshemmung hervorruft (Abb.24), in einer Konzentration von 5 x 10^{-6} M im Biotest eingesetzt (die quantitative Bestimmung erfolgte gaschromatographisch).

(* s. S. 128 unten)

Daher ist, unter der Annahme, daß das natürliche Dimethoxyacetophenon in der gleichen Konzentration eine vergleichbare Hemmwirkung hervorruft, nicht dieses, sondern die Hauptkomponente RT 27.3, die im Falle der Fraktion 29 in einer Konzentration von 2 x 10^{-5} M in der für den Keimtest verwandten Lösung vorlag, für die beobachtete Hemmwirkung verantwortlich. Das ebenfalls auf Bioaktivität geprüfte 3,5-Dihydroxyacetophenon*, aus dem der Dimethyläther auf Grund der Acidität von Phenolen erst durch Behandlung mit Diazomethan entsteht, erwies sich als inaktiv.
Das 2.6 - Isomere sowie dessen Oxim sollen vielmehr die Oxidation von IAA hemmen und wachstumsfördernde Wirkung besitzen [114) Lee, 1980].

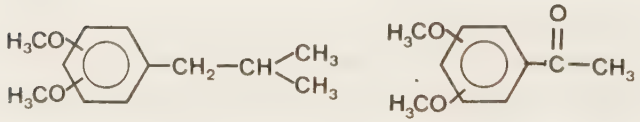


Abb.27: Strukturformeln der durch GC/MS - Untersuchungen gefundenen Verbindungen RT 26.7 (b) und RT 27.3 (a)

Der Typus des Massenspektrums der Verbindung RT 27.3 (Abb. 26a) weist ebenfalls auf eine aromatische Verbindung hin. Wie bei dem Dimethoxyacetophenon beobachtet man auch hier ein relativ intensives Molekülion m/e 194.

(* Die synthetischen Produkte wurden freundlicherweise von Dr. Schäfer, MPI, Martinsried, zur Verfügung gestellt)

Auf Grund der Art der Aufarbeitung und des geradzahligen Molekülions kann das Molekül keinen Stickstoff enthalten, sondern setzt sich nur aus C, H und O zusammen. Als mögliche Summenformeln errechnen sich $C_{12}H_{18}O_2$ oder $C_{11}H_{14}O_3$. Die Ionen m/e 65 für $C_5H_5^+$, m/e 77 für $C_6H_5^+$ und m/e 91 für $C_7H_7^+$ sind typisch für Alkylaromaten. Bei m/e 91 handelt es sich um das Tropyliumkation, das im tautomeren Gleichgewicht mit dem Benzylion steht. Da die Verbindung zwei oder drei Sauerstoffatome enthält, kommen ein substituierter Diphenoläther, ein dreiwertiger Phenoläther oder ein Aromat, der Äther- und Ketofunktionen enthält, als mögliche Strukturen in Betracht. Die für Ester typischen Bruchstücke m/e 59, m/e 87 sowie M^+-31 oder M^+-59 werden nicht beobachtet, daher kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Das durch Abspaltung von m/e 43 aus dem Molekülion entstehende Fragment m/e 151, das auf Grund seiner auffallenden Stabilität weitere Zerfallsreaktionen nur noch in geringem Maße zuläßt, ist für die Strukturzuordnung von großer Bedeutung. Ein Vergleich mit den Massenspektren verschiedener Diphenoläther zeigt, daß m/e 151 in allen Diphenoläthern mit einer am Ring substituierten CH_2 - - Gruppe als stabilstes Ion auftritt [93) Spiteller, 1979; Nr. 87, 142, 165] und bei den m-Dimethoxy - Isomeren drei mesomere Strukturen aufweist (s. Abb. 28). Bei dem aus dem Molekülion abgespaltenen Fragment der Masse 43 kann es sich entweder um eine Isopropyl- oder um eine Acetylgruppe handeln.

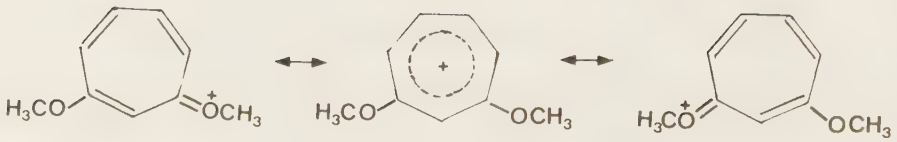


Abb.28: Mesomere Grenzformeln vom Molekülbruchstück m/e 151 bei m-Dimethoxyisomeren

Da m/e 43 für $[O{=}C{-}CH_3]^+$ im Massenspektrum des Inhibitors RT 27.3 jedoch nicht beobachtet wird, kann das Vorliegen einer Acetylgruppe ausgeschlossen werden. Außerdem wird bei Acetylverbindungen aus dem Molekülion primär ein Methylradikal eliminiert, gefolgt von dem Verlust von C≡O aus M^+-15. Das zu erwartende Ion der Masse 179 wird ebenfalls nicht gefunden. Es bleibt also nur die Möglichkeit einer Isopropylgruppe. Aus den massenspektrometrischen Betrachtungen ist daher für die Verbindung RT 27.3 die Struktur eines sek.-Butyl-Diphenoläthers als sehr wahrscheinlich abzuleiten (s. Abb. 27a). Auch hier stellt sich wieder die Frage nach der Position der Substituenten am Ring, bei der zwischen 10 möglichen Isomeren unterschieden werden kann. Abgesehen von der Ausbildung eines Ions des Tropyliumtyps stabilisieren sich die 2,4- und 2,6-Isomeren durch Konjugation der Methylendoppelbindung mit der Oxoniumdoppelbindung. Dieses mesomere System bildet sich bevorzugt bei den Verbindungen, die eine zur Methylgruppe p - ständige Methoxygruppe besitzen.

Wie massenspektrometrische Untersuchungen an Dimethoxytoluolen (DMT) zeigen [115) Flôrencio, 1977], ist im Gegensatz zu den m - Verbindungen und den Isomeren mit einer Methoxygruppe in 4 - Stellung bei den Vertretern, deren Methoxygruppen in ortho- oder para-Stellung zueinander stehen, nicht die Abspaltung von H· aus dem Molekülion zu m/e 151, sondern die Eliminierung von CH_3· (⟶ m/e 137) bevorzugt. Bei diesen Isomeren ist nach Abspaltung des Methylradikals die Möglichkeit zur Ausbildung eines energetisch günstigen chinoiden Systems gegeben. Daher wird z.B. im Spektrum von 2,5--DMT m/e 137 als Basepeak gefunden. Die geringe Intensität des Peaks m/e 137 im Massenspektrum der isolierten Verbindung spricht gegen 2,5- bzw. 2,3 - Substitution.

Die Stabilität des Ions m/e 151 deutet auf einen Substituenten in 4 - Stellung oder auf die 3,5 - Dimethoxyverbindung hin.

Gegen eine 3,5 - Substitution spricht allerdings das Fehlen eines Fragments m/e 122, das durch Verlust von CH_2O· aus m/e 152 entsteht und von Flôrencio [115 1977] bei allen drei m - Dimethoxytoluolen beobachtet wurde. Auch die zu erwartende Eliminierung eines Formaldehydradikals, die bei dem 3,5 - Isomeren auf Grund der Bildung eines chinoiden Systems energetisch günstig erscheint, wird nicht beobachtet. Die zur Klärung der Frage nach der Stellung der Methoxygruppen und zur Absicherung der ermittelten Struktur durchgeführten Syntheseversuche lieferten nur unbefriedigende Ergebnisse.

Die nach dem Prinzip einer Friedel - Crafts - Alkylierung verlaufende Umsetzung, z.B. von Resorcindimethyläther bzw. Hydrochinondimethyläther mit n-Butylchlorid erfolgte erst nach Zugabe molarer Mengen des Katalysators ($AlCl_3$) und führte zu uneinheitlichen Produkten. Bevorzugt entstanden höhermolekulare Verbindungen wie die mehrfach alkylierten Phenoläther und Produkte, die durch Kondensation mehrerer aromatischer Moleküle gebildet wurden. Durch Chromatographie an Lichroprep wurden die Hydrochinonderivate weiter aufgetrennt; die Detektion der einzelnen Fraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch und mit Hilfe des Biotests. Nach der Trennung konnte eine Verbindung, die aber immer noch Verunreinigungen aufwies, erhalten werden, die eine Keimungshemmung bei Amaranthus caudatus hervorrief. Das Massenspektrum dieser Verbindung, aufgenommen mittels GC/MS, weist zwar große Ähnlichkeit mit dem des Naturproduktes auf, die beiden Spektren sind jedoch nicht identisch. Aus der beobachteten Abspaltung eines Methylradikals aus dem Molekülion (m/e 194) zu m/e 179 und der nachfolgenden Eliminierung einer weiteren Methylengruppe zu m/e 165, das den Basepeak darstellt, war zu ersehen, daß nicht die sek. - Butyl-, sondern die 1'-Methyl-Propylverbindung synthetisiert wurde. Dieses Isomere besitzt, wie der Biotest zeigte, ebenfalls biologische Aktivität. Die Bildung des 1'-Methyl-Propylisomeren läßt sich durch die Isomerisierung, die nach Ablösung des Cl^--Anions vom Butylchlorid erfolgt, erklären.

Dabei bildete sich nicht das gewünschte sek.-Butyl-, sondern das stabilere Methyl-propylcarbeniumion, das den Aromaten elektrophil angreift.
Einen interessanten Hinweis darauf, daß es sich hier um eine Gruppe von Verbindungen mit keimungsinhibierender Wirkung handelt, lieferte die Untersuchung verschiedener substituierter Benzole auf ihre Bioaktivität.

Tab.10: Vergleich der Hemmwirkung von Dihydrohämatinsäuretrimethylester und sek.-Butyl-Dimethoxybenzol sowie strukturanaloger Verbindungen

Verbindung	% Hemmung	
	1×10^{-4}M	1×10^{-5}M
Dihydrohämatinsäure-trimethylester (natürl.)	100	100
sek.-Butyl-Dimethoxy-benzol (natürl.)	100	(2×10^{-5}M:100)
1'-Methyl-propyl-2,5-Dimethoxybenzol (synth.)	100	0
tert.-Butyl-3-Methoxy-4-Hydroxybenzol (synth.)	100	0

Während Diphenoldimethyläther ohne Alkylseitenkette wie Resorcindimethyläther und Hydrochinondimethyläther auf der einen und Alkylbenzole ohne Methoxygruppe wie sek.-Butylbenzol auf der anderen Seite keinen Einfluß auf die Keimung von Amaranthus caudatus ausüben, be-

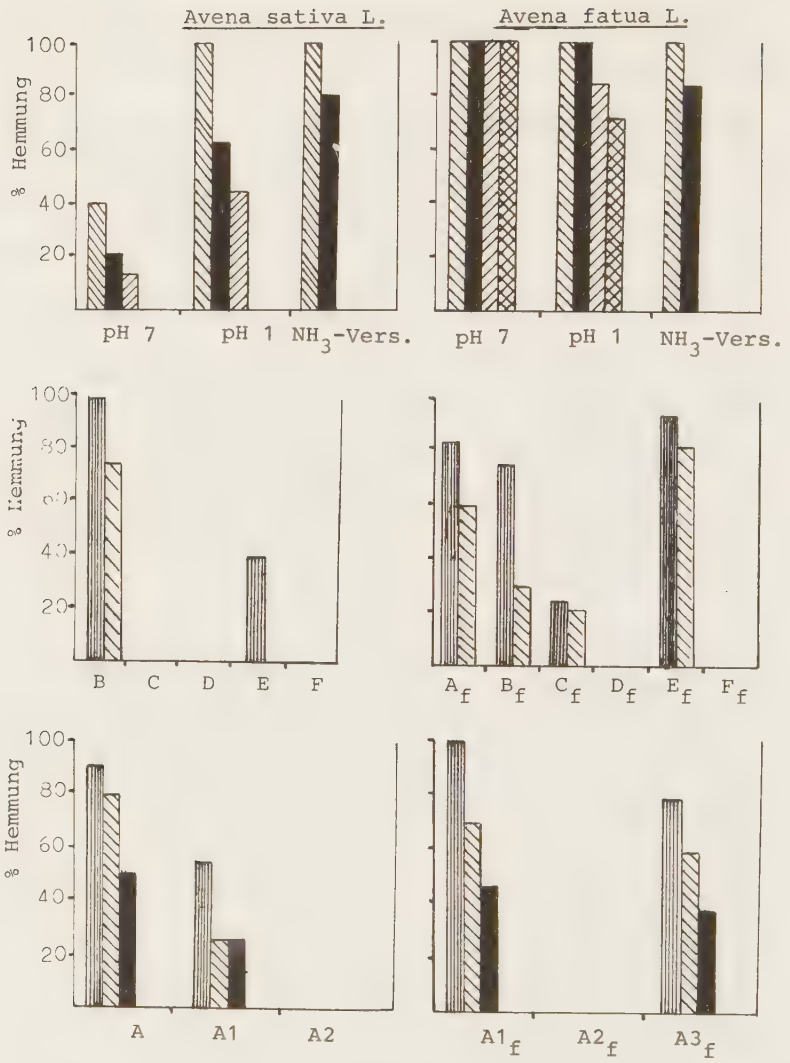
wirkt tert.-Butyl-3-Methoxy-4-Hydroxybenzol eine völlige Unterdrückung der Keimung (Konzentration: 1×10^{-4}M). Als für die Aktivität essentielle Strukturelemente sind also, neben dem aromatischen Ring, mindestens eine Methoxygruppe sowie eine verzweigte Alkylkette anzunehmen. Da eine Keimungshemmung sowohl bei dem Isomeren, bei dem sich die Methoxygruppen in p-Stellung zueinander befinden (1'-Methyl-propyl-2,5-Dimethoxybenzol), als auch bei der Verbindung mit den Methoxy- bzw. Hydroxygruppen in o-Stellung zueinander (tert.-Butyl-3-Methoxy-4-Hydroxybenzol) beobachtet wird, scheint die Position der Substituenten am Ring wenig Bedeutung für die Wirkung zu besitzen. Das gleiche gilt für den Grad der Verzweigung der Alkylkette, wie die Hemmwirkung, die gleichermaßen von Phenoläthern mit einer tert.-Butyl-, sek.-Butyl- und 1'-Methyl-propylseitenkette hervorgerufen wird, zeigt. Bei den hier diskutierten Benzolderivaten muß daher eine relativ unspezifische Wirkungsweise angenommen werden. Daneben liegt die für eine vollständige Unterdrückung der Keimung (bei Amaranthus caudatus) erforderliche Konzentration um das zehnfache höher (1×10^{-4}M) als z.B. bei Dihydrohämatinsäuretrimethylester (1×10^{-5}M), was die hohe Aktivität des Carbonsäureesters nochmals verdeutlicht. Es ist daher wahrscheinlich, daß die aus den Haferspelzen isolierten aromatischen Verbindungen nur eine untergeordnete Rolle im Hinblick auf die Ausbildung der Keimruhe von Avena sativa spielen.

7. Vergleich der keimungshemmenden Aktivitäten von Avena sativa L. und Avena fatua L.

Bei den verschiedenen Vertretern der Gattung Avenae ist die Keimruhe unterschiedlich stark ausgeprägt. Avena sativa zeigt nach der Reife eine relativ kurze Keimruhe von einigen Monaten. Sie kann sich bei Avena fatua über Jahre ausdehnen und ist beim Winterwildhafer (Avena ludoviciana Dur.) am stärksten ausgeprägt. A. ludoviciana verfällt nach der Reife in eine tiefe, sich über Jahre erstreckende Keimruhe, die auch durch exogene Applikation von GA oder anderen keimungsinduzierenden Substanzen schwer zu brechen ist [129) Quail, 1969; 130) Morgan, 1970].

In den Untersuchungen von Berrie [35) 1979] wurde versucht, den Gehalt an endogenen Keimungsinhibitoren mit der Länge der Keimruhe von Avena sativa und Avena fatua zu korrelieren. Die Konzentrationen an der in beiden Avena - Spezies nachgewiesenen "freien" und "gebundenen" ABA [89) Zemanova, 1975] ließen sich nicht mit dem physiologischen Verhalten bei der Keimung in Einklang bringen. Berrie [35) 1979] stellt aber einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten an niederen Fettsäuren (C_8 - C_{12}), vor allem Nonansäure (C_9), und der Dauer der Keimruhe fest.

Es erschien daher von großem Interesse, A. fatua sowohl auf den Gehalt an ABA zu prüfen als auch zu untersuchen, ob der aus A. sativa isolierte Hemmstoff " RT 29.5 " in A. fatua ebenfalls nachweisbar ist. Auf die von Berrie beschriebenen niederen Fettsäuren wird hier aus den unter IV.4.3 angeführten Gründen nicht eingegangen.



9: Vergleich der Hemmaktivitäten von A. sativa und A. fatua

a: Ätherextrakte bei pH 7, pH 1 und nach Hydrolyse mit NH_3

b: nach Chromatographie einer pH 1-Fraktion an Sephadex

c: nach Chromatographie eines Ätherextraktes der mit NH_3 hydrolysierten wässrigen Phase an Sephadex

(▨ = 10f, ▧ = 5f, ■ = 2.5f, ▨ = 1.25f, ▩ = 0.6f Konz.)

Die Konz. sind bezogen auf das Vol. des Rohextraktes.

7.1 Hemmaktivitäten nach Ätherextraktion bei pH 7, pH 1 und nach Verseifen der wässrigen Phase mit NH_3

7.1.1 pH 7 - Fraktion

Die Gewinnung des Rohextraktes aus den Spelzen und Karyopsen von Avena fatua sowie die Ätherextraktionen bei verschiedenen pH - Werten erfolgte wie unter III.3.1 - 3.3 beschrieben. Danach wurde die verbleibende wässrige Phase der Hydrolyse mit NH_3 unterworfen und nach Ansäuern erneut mit Äther extrahiert (s. III.3.4.3). Die ätherischen Extrakte wurden in verschiedenen Konzentrationen im Biotest mit Amaranthus caudatus auf ihre Hemmwirkung geprüft (s. Abb. 29, S.136). Ein Vergleich der mit Äther bei verschiedenen pH - Werten aus den Spelzen und Karyopsen von A. fatua und aus den Spelzen von A. sativa gewonnenen Extrakte bezüglich ihrer Bioaktivität zeigt einen gravierenden Unterschied in der Hemmwirkung der Ätherextrakte bei pH 7 (s. Abb.29). Während der Saathafer 5fach konzentriert (bezogen auf das Rohextraktvolumen, s. 11. S. 31)nur eine Keimungshemmung von 40 % bewirkt, läßt sich mit der pH 7-Fraktion aus A. fatua in der 0.6fachen Konzentration noch eine völlige Unterdrückung der Keimung erzielen. Nach den Untersuchungen von Karl [62) 1979] ist die Hemmwirkung bei beiden Arten auf Neutralsubstanzen zurückzuführen, über deren Struktur er aber keine Aussagen machen kann, und nicht auf schwache organische Säuren, die während der Extraktion bei pH 7 bereits in die Ätherphase übergehen.

Daher sind die von Berrie [35) 1979; 116) 1975] in Avena fatua nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren (C_5 - C_{11}) mit keimungsinhibierender Wirkung sowie Abscisinsäure in dieser Fraktion auszuschließen; sie sollten in dem Ätherextrakt bei pH 1 nachzuweisen sein. Berrie vermutet, daß sich in der Neutralfraktion die " gebundene " ABA befindet, die jedoch, da sie als inaktive Speicherform angesehen wird, keine Keimungshemmung zeigen sollte. Milborrow [118) 1970] und Koshimizu [117) 1968] beobachteten zwar eine durch den nicht bei pH 7 in Äther überführbaren β-D-Glycosylester der ABA im Weizenkoleoptilzylindertest hervorgerufene Wachstumshemmung, die ca. 50 % der Aktivität der freien Säure ausmacht, die Hemmwirkung ist aber nach Meinung der Autoren eventuell auf die durch Hydrolyse des Esters entstandene freie ABA zurückzuführen.

Die Haferkaryopsen enthalten bis zu 5 % Fett, das durch längeres Kochen des zerkleinerten Materials mit H_2O teilweise in den Überstand mitgerissen wird. Die Triglyceride und die langkettigen freien Fettsäuren reichern sich bei der Extraktion des neutralen wässrigen Rohextraktes mit Äther in der organischen Phase an. Über den Einfluß von Triglyceriden auf die Samenkeimung ist bisher wenig bekannt. Die Untersuchungen über die Wirkung von langkettigen Fettsäuren auf Wachstum und Keimung führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Für Palmitin-, Öl-, Linol-, Laurin- und Myristinsäure wurde wachstumshemmende Aktivität nachgewiesen [119) Mandava, 1979];

Die langkettigen Fettsäuren von C_{12} bis C_{24} sollen das Auskeimen relativ kleiner Samen fördern [120) Wanner, 1977]. Es ist daher unwahrscheinlich, daß diese lipophilen Verbindungen für die beobachtete starke Keimungshemmung der pH 7 - Fraktion von Avena fatua verantwortlich sind.

Das IR - Spektrum der pH 7 - Fraktion zeigt intensive CH_3- und CH_2 - Valenzschwingungen bei 2960 - 2850 cm^{-1}, eine breite OH - Bande bei 3600 - 2400 cm^{-1} und eine breite C=O - Bande bei 1700 cm^{-1}. Diese Banden werden vermutlich von den vorher erwähnten langkettigen Fettsäuren erzeugt. Durch Methylierung mit Diazomethan wurden die Fettsäuren in die Ester überführt und danach erneut ein IR - Spektrum aufgenommen. Jetzt zeigte sich, eine schmalere OH - Bande bei 3400 - 3200 cm^{-1}, die auf Hydroxyverbindungen wie z.B. Alkohole hinweist. Daneben liegen noch Komponenten mit Aldehyd- und Ketofunktion vor, da neben der C=O - Bande der Estergruppierung bei 1735 cm^{-1} noch weitere C=O - Banden bei 1720, 1710 und 1700 cm^{-1} zu erkennen sind.

Die pH 7 - Fraktion aus Avena fatua enthält also eine bzw. mehrere Komponenten mit stark keimungsinhibierender Wirkung, die andere Strukturmerkmale als die aus Avena sativa isolierten Inhibitoren aufweisen, aber ebenfalls niedermolekular und hitzestabil sein müssen.

Da eine weitere Anreicherung im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde, können keine genaueren Aussagen gemacht werden. Die bisher durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Keimruhe von Avena fatua beschäftigen sich überwiegend mit Verbindungen, die sich bei

saurem pH mit Äther extrahieren lassen, wie die erwähnten kurzkettigen Carbonsäuren und Abscisinsäure, und liefern daher keinen Hinweis auf lipophile Verbindungen mit biologischer Aktivität.

7.1.2 pH 1 - Fraktion und Ätherfraktion nach Hydrolyse mit NH_3

Wie Abb. 29 (S.136) zeigt, bewirkt auch der Ätherextrakt bei pH 1 aus Avena fatua eine erheblich stärkere Keimungshemmung als der aus A. sativa. Während bei letzterem in der 1.25fachen Konzentration eine Hemmwirkung von 50 % beobachtet wird, bewirkt der Flughaferextrakt in der gleichen Konzentration eine 85 %ige, in der 0.6fachen Konzentration noch eine 70 %ige Hemmung. Berücksichtigt man auch die unter 7.1.1 beschriebene Bioaktivität der Neutralfraktion, so findet man, daß ein Zusammenhang zwischen der Länge der Keimruhe und dem Gehalt der Samen an endogenen Keimungsinhibitoren besteht.

Dagegen läßt sich kein unterschiedlicher Gehalt an " gebunden " vorliegendem Hemmstoff feststellen, da die aus A. sativa bzw. A. fatua durch Hydrolyse mit NH_3 freigesetzten Hemmstoffe, die sich dann bei pH 1 in Äther überführen lassen, jeweils die gleiche Keimungshemmung bewirken (vergl. Abb.29, S.136). Diese Beobachtung erscheint ebenfalls sinnvoll, da z.B. Glycosidierung eine Form der Metabolisierung biologisch aktiver Verbindungen darstellt und die Ester wenig Einfluß auf Beginn und Dauer der Keimruhe besitzen.

7.2 Chromatographie an Sephadex LH 20

Wie aus den IR - Spektren zu ersehen war, setzen sich die pH 1 - Fraktion und die Fraktion nach Hydrolyse mit NH_3 aus Carbonsäuren zusammen, die sich mit Diazomethar zu den Estern umsetzen lassen. Im Gegensatz zu den entsprechenden Ätherextrakten aus den Spelzen von Avena sativa kann aber keine Äpfelsäure nachgewiesen werden. Im IR - Spektrum der Methylester fehlt die OH - Bande bei 3600 - 3000 cm^{-1}. Auf Grund der relativ starken C-H - Valenzschwingung bei 3010 - 3000 cm^{-1} muß es sich teilweise um ungesättigte Verbindungen handeln. Erstaunlicherweise lassen sich aber die für aromatische Verbindungen typischen Banden bei 1600, 1580 und 1500 cm^{-1} sowie zwischen 900 und 700 cm^{-1} nicht nachweisen; d.h. die Spelzen und Karyopsen von Avena fatua enthalten keine oder nur sehr wenig Phenolcarbonsäuren.

Zur weiteren Auftrennung der Carbonsäuren wurde wieder die Chromatographie an Sephadex, die bereits bei der Isolierung der Dihydrohämatinsäure gute Ergebnisse lieferte, gewählt. Die Hemmwirkung der danach erhaltenen zwei aktiven Bereiche ist in Abb. 29b dargestellt ($\underline{A}_f$- $\underline{C}_f$; $\underline{E}_f$). Da die aktive Komponente von $\underline{A}_f$ - $\underline{C}_f$ leicht auf der Säule "verschmierte", tritt die Hemmaktivität in Form einer Verteilungskurve, die in $\underline{A}_f$ ein Maximum zeigt und in $\underline{C}_f$ ausläuft, auf. Das Vorliegen verschiedener Inhibitoren ließ sich durch gaschromatographische Analyse ausschließen, da die methylierten, mittels Sublimation gereinigten Fraktionen $\underline{A}_f$ - $\underline{C}_f$ identische GC's bezüglich der Anzahl der Komponenten lieferten.

Es waren lediglich Konzentrationsunterschiede festzustellen. Die zweite aktive Fraktion $\underline{E}_f$ wird von der ersten Hemmfraktion durch einen inaktiven Bereich ($\underline{D}_f$) getrennt; d.h. es muß sich um mindestens zwei unterschiedliche Hemmstoffe handeln.

$\underline{E}_f$ erzeugt zwar eine stärkere Keimungshemmung (100 % in der 10f, 80 % in der 5f - Konzentration) als die einzelnen Fraktionen $\underline{A}_f$ - $\underline{C}_f$. Daraus kann aber nicht geschlossen werden, daß der Inhibitor in höheren Konzentrationen in den Samen von A. fatua auftritt oder daß er eine größere Wirksamkeit besitzt. Man muß berücksichtigen, daß sich einmal die Aktivität auf drei Fraktionen verteilt, während sie im zweiten Fall konzentrierter von der Säule eluiert werden konnte.

Als Bezugsbasis für die Konzentration der Lösung, die zum Biotest eingesetzt wird, dient aber in jedem Fall das Volumen des Rohextraktes (Ausgangsvolumen).

Durch die Chromatographie an Sephadex wurde neben den keimungshemmenden Verbindungen auch eine Komponente angereichert, die eine wachstumsstimulierende Wirkung besitzt. Bei Fraktion $\underline{F}_f$ konnte im Vergleich zur Wasserkontrolle ein um 10 % stärkeres Wachstum von Amaranthus caudatus beobachtet werden.

Vergleicht man die in Abb. 29b dargestellten Hemmaktivitäten der beiden Avena - Arten, so stellt man eine Übereinstimmung in der Anzahl der aktiven Fraktionen fest; außerdem weisen die Hemmfraktionen $\underline{B}$ und $\underline{B}_f$ ($\underline{A1}_f$) sowie $\underline{E}$ und $\underline{E}_f$ (aus den Abb. nicht ersichtlich) vergleichbare Elutionsvolumina auf. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß in beiden Arten die

gleichen Inhibitoren enthalten sind und daß die verschieden stark ausgeprägte Hemmwirkung auf Konzentrationsunterschieden beruht. Die pH 1 - Fraktion aus A. fatua ruft eine um den Faktor 2.5 größere Wirkung hervor als der entsprechende Extrakt aus A. sativa. Das Verhältnis der Hemmwirkung von 2.5 : 1 läßt sich auch nach der Chromatographie an Sephadex, vernachlässigt man die bei jeder Trennung auftretenden Verluste, noch feststellen.

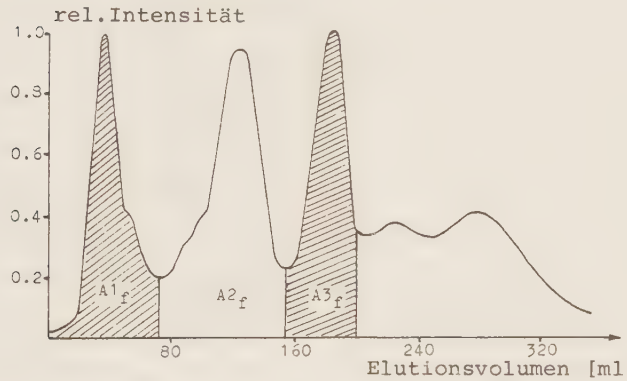


Abb.30: Chromatographie eines Ätherextraktes nach Hydrolyse mit NH_3, gewonnen aus den Spelzen und Karyopsen von Avena fatua, an Sephadex LH 20. Die Schraffierung kennzeichnet die hemmenden Fraktionen.

Im Gegensatz zu A. sativa enthält bei A. fatua die Fraktion nach Hydrolyse mit NH_3 zwei wirksame Komponenten, die sich an Sephadex trennen lassen (Abb. 30). Dabei entspricht $A1_f$ auf Grund ihres chromatographischen Verhaltens der Fraktion A bei A. sativa, die sich, wie bereits gezeigt wurde, aus Di- und Tricarbonsäuren zusammensetzt.

Es ist daher anzunehmen, daß diese Verbindungen auch in $\underline{A1}_f$ enthalten sind. Über die chemische Struktur der zweiten aktiven Komponente liegen bisher noch keine Hinweise vor. Phenolische Substanzen sind jedoch auszuschließen, da Aromaten auch im Rohextrakt nicht nachgewiesen werden konnten.

Ein Vergleich der Hemmwirkung der Fraktion nach Hydrolyse (Abb. 29a, NH_3 - Vers.) mit der von $\underline{A}$ und $\underline{A1}$ (s. Abb.29c, S.136) zeigt, daß bei Avena sativa die Bioaktivität, die vor der Säulentrennung beobachtet wurde, nach der Chromatographie vollständig wiedergefunden wird, wenn man die Hemmwirkung von $\underline{A}$ und $\underline{A1}$ addiert. Ein 2.5fach konzentrierter Extrakt vor der Auftrennung bewirkt eine Keimungshemmung von 80 %, nach der Auftrennung beobachtet man bei $\underline{A}$ + $\underline{A1}$ in der gleichen Konzentration eine Hemmung von 75 %.

Dagegen läßt sich bei A. fatua nach Chromatographie an Sephadex eindeutig eine größere Aktivität feststellen (s. Abb. 29c, S.136). Betrachtet man wieder die 2.5fach konzentrierten Extrakte, so erhält man durch $\underline{A1}_f$ + $\underline{A2}_f$ eine Hemmung von 90 %. Dieser Wert liegt sogar geringfügig höher als der, der vor der Säulentrennung gefunden wird (85 %, vergl. Abb. 29a, S. 136).

Die nicht weiter aufgereinigten Extrakte nach der Hydrolyse aus A. sativa und A. fatua zeigen jedoch vergleichbare Hemmaktivitäten von 80 bzw. 85 %. Die Aktivitätszunahme nach Chromatographie an Sephadex läßt darauf schließen, daß die Fraktion nach Hydrolyse mit NH_3 im Falle von A. fatua ebenfalls eine wachstumsstimulierende Komponente besitzt, die abgetrennt wurde.

7.3 Charakterisierung der wirksamen Komponente der Fraktion B_f

7.3.1 Chromatographie an Lichroprep

Im weiteren sollte untersucht werden, ob der aus den Spelzen von A. sativa isolierte und als Dihydrohämatinsäure bzw. deren Trimethylester identifizierte Hemmstoff in A. fatua ebenfalls nachzuweisen ist. Es bot sich an, die Fraktion $\underline{A}1_f$ (vergl. Abb. 29c, S. 136) bevorzugt zu betrachten, da sie auf Grund der Aufarbeitung der Fraktion $\underline{A}$ aus A. sativa, die die zweite Anreicherungsstufe des Hemmstoffs darstellt, entspricht. Wie unter IV.4.2 und 4.3 bei A. sativa beschrieben, wurde $\underline{A}1_f$ methyliert und die Methylester mittels Kurzwegdestillation gereinigt. Der nach jedem Schritt durchgeführte Biotest ergab, daß die Hemmwirkung auch nach Methylierung erhalten bleibt. Die aktive Komponente erwies sich ebenfalls als sublimierbar.

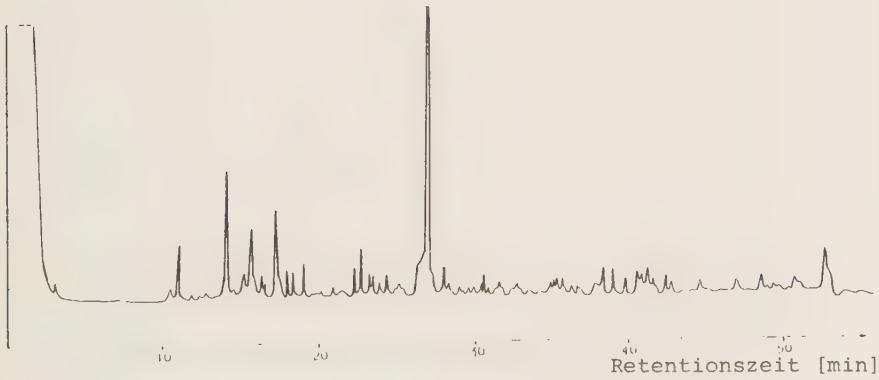


Abb.31: GC der aktiven Fraktion $\underline{A}1_f$ (A. fatua), methyliert und sublimiert (Säule: Glaskapillarsäule OV 101, 25 m; Weitere Bedingungen s. III.B.3, S. 41)

In Abb. 31 ist das Gaschromatogramm der methylierten, sublimierten Fraktion $\underline{A1}_f$ dargestellt. Man beobachtet eine Hauptkomponente, die eine Retentionszeit von 27 min aufweist, also nicht mit dem Dihydrohämatinsäuretrimethylester identisch ist. Dieser erscheint auf der OV 1 - Säule (Länge: 25 m) nach einer Retentionszeit (RT) von 29.5 min. Das Gaschromatogramm der methylierten Fraktion $\underline{A1}_f$ zeigt jedoch in dem interessanten Bereich zwischen RT 29 und RT 30 nur drei Peaks, deren relative Intensität maximal 2 % beträgt. Falls $\underline{A1}_f$ Dihydrohämatinsäuretrimethylester enthält, tritt dieser, wie aus dem vorliegenden Gaschromatogramm geschlossen werden muß, in einer sehr geringen Konzentration auf, die nicht ausreicht, um die beobachtete Hemmwirkung zu erklären (vergl. Abb. 29c, S.136). Daraus läßt sich schließen, daß nicht der genannte Ester, sondern einer der zahlreichen weiteren Peaks die aktive Komponente in $\underline{A1}_f$ darstellt. Um den Hemmstoff weiter anzureichern und die Anzahl der in Frage kommenden Verbindungen einzugrenzen, wurde eine Chromatographie des Methylestergemisches an Lichroprep durchgeführt, die aber im Gegensatz zur Fraktion $\underline{A}$ aus A. sativa (vergl. IV.5.1) kein befriedigendes Ergebnis lieferte. Nach der Trennung ließ sich keine Bioaktivität mehr feststellen. Für diese Beobachtung gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder sind mehrere Komponenten, die nur gemeinsam eine Wirkung entfalten, für die Keimungshemmung verantwortlich, oder der Hemmstoff wird durch den

Kontakt mit dem Kieselgel chemisch verändert und so inaktiviert oder irreversibel am Kieselgel adsorbiert. Die erste Möglichkeit ist auszuschließen,da auch nach Vereinigung der chromatographisch erhaltenen Fraktionen keine nennenswerte Aktivität gefunden wurde. Dagegen konnte nach längerem Spülen der Säule mit einem polaren Lösungsmittel wie Methanol ein Teil der Bioaktivität in der Methanollösung nachgewiesen werden, was für die zweite Möglichkeit spricht. An dieser Stelle muß erwähnt werden, daß die hier beschriebene Inaktivierung bzw. Adsorption der aktiven Komponente am Kieselgel bereits bei der Untersuchung der Fraktion B (erhalten nach Chromatographie der pH 1 - Fraktion aus A. sativa an Sephadex LH 20, vergl. IV.1.3, S.55) beobachtet wurde. B besteht wie A und $A1_f$ aus einem Carbonsäuregemisch, wobei Äpfelsäure wieder die Hauptkomponente darstellt, und läßt sich glatt mit Diazomethan zu den Methylestern umsetzen. Diese bewirken auch nach Sublimation eine Keimungshemmung, die der der freien Säuren entspricht. Es gelang aus dem oben genannten Grund jedoch nicht, die Ester zu trennen. Daher war es nicht überraschend, daß die Chromatographie von B_f (methyliert und mittels Kurzwegdestillation gereinigt) genauso wenig zu einem Erfolg führte. (Die in Abb.29b dargestellten Fraktionen A_f-C_f, die die Trennung der pH 1 - Fraktion an Sephadex lieferte, erwiesen sich, wie bereits erwähnt, als identisch. Sie wurden gemeinsam behandelt und werden im Folgenden als $B_f$bezeichnet.)

Aus den durchgeführten Trennversuchen erhält man jedoch eine wertvolle Information: Die Übereinstimmung, die die Fraktionen B, $A1_f$ und B_f in ihrem Verhalten gegenüber Kieselgel zeigen, spricht dafür, daß die für die Keimungshemmung verantwortliche Verbindung in den drei Fraktionen identisch ist. Die Tatsache, daß sich Dihydrohämatinsäureester mittels Chromatographie an Lichroprep isolieren läßt, führte außerdem zu dem Schluß, daß dieser Ester in den vorliegenden Fällen nicht die aktive Komponente darstellt.

7.3.2 Präparative Gaschromatographie der Fraktion B_f

Es mußte also eine möglichst schonende Methode zur Trennung der Ester gefunden werden. Auf Grund ihrer Flüchtigkeit bieten Ester die Voraussetzung für eine gaschromatographische Trennung im präparativen Maßstab, die sich daher als Trennmethode anbot. Es erschien sinnvoll, bevorzugt die Fraktion zu untersuchen, die die stärkste Hemmung hervorruft, also B_f. Die in einer ätherischen Lösung vorliegenden Ester wurden, wie unter III.A.10.2 beschrieben, in fünf Fraktionen aufgetrennt. Das Gaschromatogramm ist in Abb.32 dargestellt. Es zeigt zwei Hauptkomponenten, die in Fraktion II_f bzw. III_f neben zahlreichen Nebenkomponenten enthalten sind und stimmt bezüglich Anzahl und Konzentration der Komponenten mit dem Gaschromatogramm der analytischen Trennung überein.
Die Fraktionen I_f - V_f wurden im Biotest, dessen Ergebnis aus Tab. 11 zu ersehen ist, auf ihre keimungshemmende Wirkung geprüft.

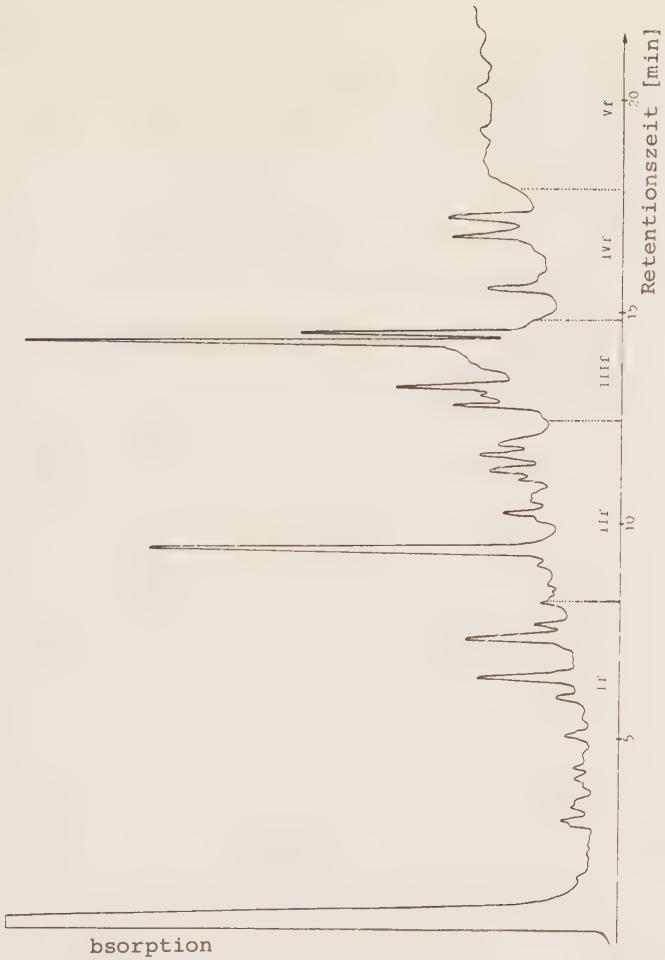


Abb.32: Chromat ramm der präparativen Gaschromatographie der Fraktion B_f

Säule: gepackte Stahlsäule, Länge: 50 m, 5 % FFAP auf Varaport (80/100 mesh)

Detektor: FID; Injektortemp.: 250°C

Einspritzung: 4.5 µl; Temperaturprogramm: 150 -240°C/ 3°C/min

Split: 9 Teile Ausgang, 1 Teil Detektor

Tab.11: Ergebnis des Biotests der Fraktionen $\underline{I}_f$ - $\underline{V}_f$, erhalten durch Auftrennung von $\underline{B}_f$ mittels präparativer Gaschromatographie

Fraktionsnr.	% Hemmung
$\underline{I}_f$	100
$\underline{II}_f$	24
$\underline{III}_f$	77
$\underline{IV}_f$	57
$\underline{V}_f$	(24 % Wachstumsförderung gegenüber H_2O - Kontrolle)

Das Ergebnis des Biotests verdeutlicht erneut die Schwierigkeit, einen Naturstoff rein und in einer zur Strukturaufklärung ausreichenden Menge darzustellen. Nach mehreren Anreicherungsschritten wird die Hauptaktivität, in Übereinstimmung mit der Fraktion A aus A. sativa (vergl. Abb.13, S.87), nicht in einer der Fraktionen, die eine Hauptkomponente enthalten ($\underline{II}_f$ und $\underline{III}_f$, rel. Intensität: 70 bzw. 100 %, vergl. Abb.32), sondern in $\underline{I}_f$ gefunden. Diese weist zwei Peaks der relativen Intensität von 15 % neben 9 Nebenkomponenten einer rel. Intensität von maximal 5 % auf. Man muß davon ausgehen, daß auch eine dieser in geringen Konzentrationen auftretenden Verbindungen für die Hemmwirkung verantwortlich sein kann; d.h. es kommen noch immer 11 mögliche Substanzen bzw. Strukturen in Frage. Es war jedoch nicht möglich, $\underline{I}_f$ mit Hilfe der präparativen Gaschromatographie weiter aufzutrennen.

Wie aus dem Ergebnis des Biotests ersichtlich ist, enthält $\underline{II}_f$ noch geringe Mengen der aktiven Komponente von $\underline{I}_f$, und der zweite Hemmstoff verteilt sich auf $\underline{III}_f$ und $\underline{IV}_f$. Dieses "Verschmieren" der Aktivität ist nicht auf die Wahl des Säulenmaterials zurückzuführen. Vielmehr beweisen die hohe Auflösung sowie die Schärfe der Peaks die ausgezeichnete Trennleistung der Säule. Ein Problem ergibt sich bei dem manuell ausgeführten Schneiden der Proben. Ein Zehntel der aufgetrennten Substanz wird dem Detektor, der Rest dem Säulenausgang zugeführt. Zwischen dem Zeitpunkt der Anzeige durch den Schreiber und dem Austritt der Substanz können sich geringe Zeitdifferenzen ergeben, sodaß sich Verbindungen, die dicht aufeinander folgen, nicht exakt schneiden lassen. Außerdem waren zur Auftrennung der Fraktion $\underline{B}_f$ aus 100 g Ausgangsmaterial 15 Einspritzungen notwendig; dabei wurden die zusammengehörenden Fraktionen gemeinsam an einem Tenaxröhrchen adsorbiert (vergl. III.A.10.2). Obwohl die Trennungen gut reproduzierbar waren, ließen sich kleine Überlappungen der Fraktionen auf Grund der durch den Wechsel der Vorlage hervorgerufenen Änderung der Trägergasgeschwindigkeit ohne automatischen Fraktionsschneider nicht vermeiden.

Hier wird noch einmal demonstriert, daß man nicht von dem Inhibitor aus A. fatua sprechen kann; allein in $\underline{B}_f$, die nur eine von mehreren aktiven Fraktionen neben der pH 7 - Fraktion (vergl. IV.7.1.1), der Fraktion nach Hydrolyse und $\underline{E}_f$ (vergl. Abb.29, S.136) darstellt,

lassen sich zwei aktive Komponenten nachweisen. Die für die Hemmwirkung verantwortlichen Substanzen müssen nicht unbedingt einen Einfluß auf die Keimruhe von A. fatua ausüben, sie bewirken zumindest bei exogener Applikation eine Reduzierung der Keimung von Amaranthus caudatus. In diesem Zusammenhang soll noch auf Fraktion V_f hingewiesen werden, die eine wachstumsstimulierende Substanz enthält. Eine Verbindung, die den gleichen Effekt zeigt, wurde bereits durch Chromatographie der pH 1 - Fraktion an Sephadex (vergl. IV.7.2) abgetrennt. Bei Vertretern der gleichen Substanzgruppe, in diesem Fall der Carbonsäureester, werden also anthagonistische Effekte beobachtet; auf Grund geringer Strukturunterschiede wird entweder eine Stimulierung oder eine Hemmung von Wachstum und Keimung bewirkt.

7.3.3 GC/MS der Fraktion $\underline{I}_f$

Die gaschromatographische Trennung (im analytischen Maßstab), lieferte, wie schon das Chromatogramm der präparativen Gaschromatographie vermuten ließ, 12 Hauptkomponenten, von denen Massenspektren aufgenommen wurden. Das Chromatogramm der GC/MS - Trennung zeigt Abb. 33 (S.153). Aus der Intensität der auftretenden Peaks läßt sich nicht ersehen, auf welche Komponente die Hemmwirkung von $\underline{I}_f$ zurü kzuführen ist, da 6 Komponenten in vergleichbaren Konzentrationen vorliegen ($2_f, 3_f, 4_f, 6_f, 10_f, 12_f$), lediglich 5_f kann als Hauptkomponente angesehen werden.

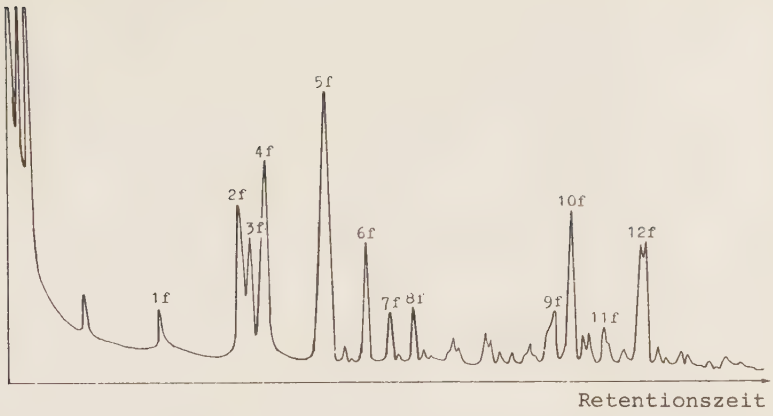


Abb.33: Chromatogramm der GC/MS - Trennung der Fraktion $\underline{I}_f$ nach präp. GC
Säule: Glaskapillarsäule OV 101, 25 m
Scan : m/e 41 - 400, Start nach 4 min
Weitere Bedingungen s. III.B.3, S. 41

Weiterhin findet man noch vier Verbindungen, die in vergleichsweise geringen Konzentrationen auftreten. In Tab. 12 (S. 154) sind die Massenspektren von $\underline{1}_f$ - $\underline{12}_f$, und, soweit es bisher gelungen ist, die identifizierten Verbindungen aufgeführt. Die mittels Direkteinlaß der authentischen Substanzen bzw. aus Literaturdaten erhaltenen Vergleichsspektren der Komponenten $\underline{1}_f$, $\underline{3}_f$, $\underline{4}_f$, $\underline{6}_f$ und $\underline{9}_f$ sind der Tab. 7 (S. 89) zu entnehmen. Bei der Betrachtung der in $\underline{I}_f$ identifizierten Verbindungen stellt man eine auffallende Übereinstimmung zwischen $\underline{I}_f$ und der Fraktion $\underline{A}$ aus A. sativa fest (vergl. Tab.7, S.89).

Tab. 12: Identifizierte Verbindungen und Massenspektren der nach GC/MS - Trennung der Fraktion I_f erhaltenen Komponenten 1_f - 12_f. Die angegebenen Komponenten wurden im Gaschromatogramm Abb. 33 (S. 153) nach steigenden Retentionszeiten nummeriert.

Nr.	Summenformel Name der Verbindung	Strukturformel	MG	Massenspektrum m/e (% rel. Int.)
1_f	$C_6H_{10}O_4$ Bernsteinsäure-dimethylester	$H_3COOC-CH_2$ $H_3COOC-CH_2$	146	115(100), 114(28), 87(31), 70(14), 61(12), 59(50), 55(66), 43(20), 41(94)
2_f	$C_7H_{12}O_5$ α-Methyl-α-Methoxy-malonsäuredimethylester	H_3COOC, CH_3 H_3COOC, OCH_3 (an C)	176	145(3), 88(37), 59(11), 57(12), 45(100), 43(16)
3_f	$C_7H_{12}O_5$ Methoxybernstein-säuredimethylester	$H_3COOC-CH_2$ $H_3COOC-CH-OCH_3$	176	144(4), 117(41), 113(4), 85(3), 74(4), 75(100), 59(18), 55(7), 47(10), 45(12), 43(14)
4_f	$C_6H_{10}O_5$ Äpfelsäuredimethyl-ester	$H_3COOC-CH_2$ $H_3COOC-CH-OH$	162	131(6), 130(5), 113(5), 103(100), 75(9), 71(83), 61(44), 59(31), 41(91)
5_f	Hydroxydicarbonsäureester			175(2), 159(4), 143(5), 131(25), 117(16), 101(5), 87(27), 85(12), 59(100), 57(8), 55(10), 43(33)
6_f	$C_9H_{16}O_5$ Isopropyl-Äpfel-säuredimethylester	$H_3COOC-CH_2$ $H_3COOC-C-OH$ $H_3C-CH-CH_3$	204	161(11), 146(7), 145(69), 130(12), 129(10), 127(26), 113(28), 102(17), 101(33), 85(5), 74(13), 71(100), 59(17), 43(64)
7_f	ungesättigter Tricarbonsäureester			173(2), 157(2), 145(20), 139(6), 131(6), 105(10), 101(100), 89(7), 69(6), 59(35), 57(27), 43(28)
8_f	Methoxycarbonsäureester			173(3), 157(6), 141(12), 129(31), 125(30), 115(100), 113(14), 101(18), 97(19), 87(21), 69(26), 59(56), 55(86), 45(88), 43(36)
9_f	$C_9H_{14}O_7$ Citronensäure-trimethylester	$H_3COOC-CH_2$ $H_3COOC-C-OH$ $H_3COOC-CH_2$	234	175(16), 144(7), 143(100), 101(70), 74(6), 69(13), 59(24), 57(14), 41(26)
10_f	α-Methyl-Methoxycarbonsäureester			200(6), 171(5), 166(5), 160(15), 157(14), 145(27), 141(20), 128(20), 114(17), 109(72), 99(14), 89(32), 88(31), 59(36), 45(100), 43(30)
11_f	$C_{10}H_{18}O_6$ α-Methyl-verzweigter Di- oder Tricarbon-säureester		234	175(10), 157(20), 146(4), 143(11), 131(12), 115(25), 105(17), 103(96), 88(87), 71(79), 61(42), 59(48), 57(34), 55(27), 45(35), 43(100)
12_f	$C_9H_{14}O_6$ Propantricarbons.-trimethylester	$H_3COOC-CH_2$ $H_3COOC-CH$ $H_3COOC-CH_2$	218	187(12), 159(6), 143(8), 127(4), 115(100), 87(18), 59(26), 55(28), 43(9)

In beiden aktiven Fraktionen lassen sich die Ester der Bernstein- und Methoxybernsteinsäure, der Äpfel- und Citronensäure sowie α-Hydroxy-α-Isopropylbernsteinsäure nachweisen. Von diesen Substanzen ist bereits bekannt, daß sie keine keimungshemmende Wirkung besitzen. Auch Propantricarbonsäuretrimethylester ($\underline{12}_f$) kann als möglicher Inhibitor ausgeschlossen werden, da er neben dem Hemmstoff "RT 29.5" in Fraktion $\underline{70}$ als Verunreinigung auftritt (vergl. Abb.15, S.93). Trotz Übereinstimmung, die auf eine strukturelle Ähnlichkeit der aktiven Komponente in $\underline{I}_f$ mit Dihydrohämatinsäuretrimethylester schließen läßt, kann dieser unter den Verbindungen, von denen Massenspektren aufgenommen wurden, nicht nachgewiesen werden. Die Möglichkeit, daß er eine der Komponenten darstellt, die auf Grund ihrer geringen Konzentration massenspektrometrisch nicht erfaßt wurden, läßt sich jedoch nicht ausschließen. Auch unter der Annahme, daß diese Möglichkeit zutrifft, läßt sich die Stärke der durch $\underline{I}_f$ hervorgerufenen Keimungshemmung nur durch einen weiteren Hemmstoff erklären, der v.a. unter den Substanzen $\underline{5}_f$, $\underline{7}_f$, $\underline{8}_f$, $\underline{10}_f$ und $\underline{11}_f$ zu suchen ist. Die Strukturen dieser fünf Verbindungen konnten aus den vorliegenden Massenspektren bisher nicht abgeleitet werden. Von besonderem Interesse im Hinblick auf essentielle Strukturelemente erscheinen die Komponenten $\underline{10}_f$ und $\underline{11}_f$. Auf Grund des beobachteten Schlüsselions m/e 88 enthalten sie wie Dihydrohämatinsäure bzw. der Ester eine α-Methylverzweigung.

Eine gestreckte C - Kette, bestehend aus mindestens vier Gliedern, die möglicherweise eine Vorraussetzung für die keimungshemmende Wirkung ist, könnte ebenfalls vorliegen, da die Molekulargewichte um 200 bzw. 234 (m/e 175 + 59; $\underline{11}_f$) liegen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Dihydrohämatinsäuretrimethylester in der aktiven Fraktion $\underline{I}_f$ aus A. fatua nicht identifiziert werden konnte, es sich bei der aktiven Komponente aus den vorher genannten Gründen jedoch um eine Verbindung handeln muß, die bezüglich ihrer Struktur eine weitgehende Übereinstimmung mit dem aus A. sativa isolierten Hemmstoff aufweist. Wie die Prüfung verschiedener Tricarbonsäureester auf Bioaktivität ergab, bewirkt z.B. 2-Äthyl-3-Carbomethoxybernsteinsäuredimethylester ebenfalls eine Reduzierung der Keimung von Amaranthus caudatus. Diese Beobachtung und die Untersuchung von $\underline{I}_f$ lassen darauf schließen, daß der Dihydrohämatinsäuretrimethylester zu einer Gruppe strukturanaloger Verbindungen mit keimungsinhibierender Wirkung zu zählen ist.

Eine wichtige Eigenschaft der hier beschriebenen Hemmstoffe soll noch einmal betont werden: Weder beim Dihydrohämatinsäuretrimethylester sowie bei der angereicherten Hemmstofffraktion $\underline{I}_f$ aus A. fatua noch bei den aktiven aromatischen Verbindungen wurde eine irreversible Schädigung des Testsaatguts oder ein " Malformineffekt ", d.h. Verfärbung und Verkrümmung der Keimwurzeln, beobachtet.

Nach Überführen der Samen aus der Hemmstofflösung in bidestilliertes Wasser keimten diese innerhalb von 12 - 24 Stunden normal aus.

Abscisinsäure ließ sich in Fraktion $\underline{A}_f$ bzw. $\underline{I}_f$ massenspektrometrisch nicht nachweisen, ebensowenig die Metaboliten Phaseinsäure und Dihydrophaseinsäure.

Die Isolierung der ABA erfolgt bei Berrie [116) 1975] durch Extraktion der Flughafersamen (bespelzte Karyopsen) mit Methanol, Überführen der freien ABA bei pH 2 in Äther, sowie Hydrolyse der verbleibenden wässrigen Methanolphase mit NaOH und erneuter Ätherextraktion bei pH 2 zur Erfassung der " gebundenen " ABA.

Die vereinigten Ätherextrakte werden an Sephadex LH 20 mit dem Elutionsgemisch Methanol/Benzol = 95/5 chromatographiert. Wie die eigenen Untersuchungen zeigten, werden bei Verwendung von Methanol als Solvens auch alicyclische und aromatische Verbindungen leicht von dem relativ hydrophoben Sephadex LH 20 eluiert, während sie mit Wasser nur geringe Wanderungsgeschwindigkeiten aufweisen. In diesem, zur raschen Abtrennung der Di- und Tricarbonsäuren geeigneten System,benötigt ABA ein größeres Elutionsvolumen und stellt daher möglicherweise die aktive Komponente der Fraktionen $\underline{A3}_f$ (s. Abb.29c, S. 136) oder $\underline{E}_f$ (s. Abb.29b) dar.

Auf Grund ihrer großen Wanderungsgeschwindigkeit sollte die Dihydrohämatinsäure ebenfalls in der von Berrie isolierten ABA - haltigen Fraktionen auftreten. Die weiteren Untersuchungen bzw. Auftrennungen dieser Fraktion (Chromatographie an Polyclar AT, DC - Trennung an

Kieselgel GF) beschränken sich jedoch auf die Verbindung, die den gleichen R_f - Wert wie authentische ABA aufweist. Daher ist der Autor nicht in der Lage, Aussagen über weitere aktive Fraktionen oder Inhibitoren zu machen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Untersuchungen zur Isolierung und Strukturaufklärung von Keimungsinhibitoren von Avena sativa und Avena fatua zeigten, daß in den Spelzen bzw. Karyopsen beider Avena - Arten zahlreiche Hemmstoffe vorhanden sind.

2. Durch Extraktion eines wässrigen Rohextraktes aus den Spelzen von Avena sativa mit Äther bei pH 1 lassen sich freie Hemmstoffe anreichern. Nach anschließender Chromatographie der pH 1 - Fraktion an Sephadex LH 20 wurden eine Fraktion B, die die Hauptaktivität aufweist (≙ 100 %), und eine Fraktion E, die 40 % der von B hervorgerufenen Keimungshemmung zeigt, erhalten. B und E hemmen sowohl die Keimung von Avena sativa als auch von Amaranthus caudatus. B setzt sich aus aliphatischen Di - und Tricarbonsäuren zusammen, die sich mit Diazomethan in die Methylester überführen lassen. Der Methylester der aktiven Komponente der Fraktion B weist eine mit der der freien Säure vergleichbare Bioaktivität auf.

3. Die nach Ätherextraktion bei pH 1 verbleibende wässrige Phase enthält einen (vermutlich als Zuckerester) gebunden vorliegenden Hemmstoff. Durch Hydrolyse mit NH_3 läßt sich die aktive Komponente freisetzen, die danach bei pH 1 mit Äther extrahierbar ist und sich durch Chromatographie an Sephadex LH 20 anreichern läßt. Die Auftrennung des Ätherextraktes nach Ammoniakbehandlung liefert im Gegensatz zur pH 1 - Fraktion nur eine aktive Fraktion (A), deren keimungshem-

mende Wirkung mit der von B vergleichbar ist. Neben ihrer Inhibitorwirkung im Keimtest mit Avena sativa und Amaranthus caudatus zeigt Fraktion A wachstumsretardierende Wirkung im Weizenkoleoptilzylindertest. Sie hemmt das Wachstum der Zellkultur AN 1175 (Pimpinella anisum), wobei die Wirkung von 2.4-D teilweise aufgehoben wird, und enthält eine Komponente, die spezifisch an die NAA - Bindungsstelle in der Membran bindet.

4. Wie Fraktion B stellt auch A ein Gemisch verschiedener aliphatischer Di - und Tricarbonsäuren dar, die zur weiteren Auftrennung ebenfalls in die Methylester überführt wurden. Nach der Umsetzung ließ sich der Hemmstoff sublimieren, während bei dem Versuch, die freien Säuren zu sublimieren, die Bioaktivität nur im Sublimationsrückstand gefunden wurde. Massenspektrometrisch und durch Vergleich mit den authentischen Verbindungen konnten Äpfelsäuredimethylester als Hauptkomponente und daneben weitere Di - bzw. Tricarbonsäureester wie Malonsäure -, Bernsteinsäure -, Glutarsäure -, Methoxybernsteinsäure -, Isopropyläpfelsäuredimethylester sowie Citronensäuretrimethylester identifiziert werden. Diese Carbonsäureester weisen jedoch keine Hemmaktivität auf.
5. Nach einer weiteren Auftrennung der methylierten Fraktion A wurde mittels Kombination von Gaschromatographie und Biotest die Verbindung "RT 29.5", deren Peakintensität im Gaschromatogramm nur ca. 1.5 %, bezogen auf die Hauptkomponente, ausmacht, als aktive Komponente identifiziert.

6. Bei dem Hemmstoff "RT 29.5" handelt es sich um 1,3,4-Pentantricarbonsäuretrimethylester (Dihydrohämatinsäuretrimethylester). Die Struktur wurde massenspektrometrisch mit Hilfe von Deuteriummarkierung und hochauflösender Massenspektrometrie ermittelt und durch Synthese bestätigt. Von dem synthetisierten Diastereomerengemisch aus threo - und erythro - Dihydrohämatinsäuretrimethylester liegt vermutlich die threo - Form natürlich im Pflanzenmaterial vor und ist für die biologische Wirkung entscheidend. Bei exogener Applikation bewirkt die natürliche Verbindung in einer Konzentration von 1×10^{-5}M eine völlige Unterdrückung der Keimung von Amaranthus caudatus, während sie im Keimtest mit Avena sativa eine Wachstumsreduzierung der Koleoptile und der Keimwurzel von 80 % hervorruft. Das synthetische Gemisch aus threo - und erythro - Form zeigt in der gleichen Konzentration eine Keimungshemmung von 54 % bei Amaranthus caudatus.
7. Dihydrohämatinsäure konnte sowohl aus einem bereits 3 Jahre gelagerten Spelzengemisch als auch aus Spelzen von sich im Stadium der sekundären Keimruhe befindenden Samen von A. sativa isoliert und in Form des Trimethylesters identifiziert werden. Die dabei ermittelten unterschiedlichen Hemmstoffkonzentrationen (ca. 0.1 µg/g Trockengewicht im ersten, ca. 1.3 µg/g im zweiten Fall) sprechen für eine teilweise Aufhebung der Keimruhe durch Abbau der in den Spelzen vorhandenen Inhibitoren.

Die von den aktiven Fraktionen sowie von dem Dihydrohämatinsäureester hervorgerufene Hemmwirkung ist reversibel; nach Überführen des Testsaatguts aus der Hemmstofflösung in bidest. Wasser keimen die Samen innerhalb von 12 - 24 Stunden aus.

8. Dihydrohämatinsäure wurde, soweit bekannt, bisher nicht in grünen Pflanzen gefunden und daher auch nicht auf biologische Aktivität geprüft. Während der Einfluß von Mono- und Dicarbonsäuren und deren Ester auf die Keimung bereits untersucht wurde, liegen frühere Arbeiten über Tricarbonsäuren nicht vor. Es gibt Hinweise darauf, daß der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Hemmstoff zu einer Gruppe strukturanaloger Verbindungen mit biologischer Wirkung zählt, bei denen neben mehreren Carboxylfunktionen eine gerade C_4-Kette sowie eine Methylgruppe in α-Stellung zu einer Carboxylfunktion essentielle Strukturelemente zu sein scheinen.
9. Neben Dihydrohämatinsäure bzw. dem Ester konnten aus den Spelzen "dormanter" Samen von A. sativa zwei aromatische Verbindungen mit keimungsinhibierender Wirkung isoliert werden, die als sek.-Butyl-Dimethoxybenzol (Hauptkomponente) und Dimethoxyacetophenon (Nebenkomponente) identifiziert wurden. Die Strukturen wurden durch spektroskopische Vergleiche mit synthetischen Isomeren bestätigt; es war jedoch nicht möglich, aus den Massenspektren die Positionen der Substituenten am Aromaten zu ermitteln. Die wirksame Konzentration der im Biotest mit

Amaranthus caudatus auf Hemmaktivität getesteten synthetischen Verbindungen 3,5-Dimethoxyacetophenon und tert.-Butyl-3-Methoxy-4-Hydroxybenzol liegt bei 1 x 10^{-4}M, während das natürliche sek. Butyl-Dimethoxybenzol in einer Konzentration von 2 x 10^{-5}M noch keimungshemmende Wirkung zeigt. Da sich Phenole mit Diazomethan zu den Methyläthern umsetzten lassen, müssen die Dihydroxy - und nicht die Dimethoxyverbindungen als Naturprodukte angesehen werden. Das ebenfalls auf Bioaktivität untersuchte 3,5-Dihydroxyacetophenon zeigt jedoch keine Hemmwirkung; daher spielen die hier diskutierten aromatischen Substanzen vermutlich keine Rolle bei der Keimruhe von Avena sativa.

10. Flughafer (Avena fatua), der eine ausgeprägtere Keimruhe als Avena sativa zeigt, enthält eine größere Anzahl endogener, nicht gebundener Keimungsinhibitoren in höheren Konzentrationen als der Saathafer; d.h. Dauer und Tiefe der Keimruhe lassen sich mit dem Hemmstoffgehalt korrelieren. Besonders gravierend ist der unterschiedliche Gehalt an biologisch wirksamen Neutralsubstanzen: Während ein aus dem Rohextrakt bei pH 7 gewonnener Ätherextrakt aus A. sativa in der 5fachen Konzentration nur 40 % Keimungshemmung bewirkt, läßt sich mit dem entsprechenden Extrakt aus A. fatua in der 0.6-fachen Konzentration noch eine vollständige Unterdrükkung der Keimung von Amaranthus caudatus erzielen. Auch die pH 1 - Fraktion zeigt bei A. fatua eine doppelt so starke Hemmaktivität wie bei A. sativa. Dagegen läßt sich kein unterschiedlicher Gehalt an "gebunden" vorliegendem Hemmstoff feststellen.

11. Die Chromatographie der pH 1 - Fraktion aus A. fatua an Sephadex lieferte zwei aktive Fraktionen $\underline{B}_f$ und $\underline{E}_f$, die vergleichbare Hemmaktivitäten aufweisen; daneben wurde eine Fraktion mit einer wachstumsstimulierenden Komponente abgetrennt ($\underline{F}_f$). Im Gegensatz zu A. sativa enthält die Fraktion nach Hydrolyse mit NH_3 zwei aktive Komponenten, die sich durch Chromatographie an Sephadex trennen lassen ($\underline{A1}_f$, $\underline{A3}_f$). $\underline{A1}_f$ stellt wie Fraktion $\underline{A}$ aus A. sativa ein Carbonsäuregemisch dar; die aktive Komponente ist ebenfalls methylierbar und sublimierbar. Sie konnte jedoch nicht weiter angereichert werden, da sie bei der Chromatographie an Lichroprep irreversibel adsorbiert wird.

12. $\underline{B}_f$ wurde nach Methylierung und Sublimation mit Hilfe der präparativen Gaschromatographie aufgetrennt. Danach ließ sich die Hauptaktivität in Fraktion $\underline{I}_f$ nachweisen. $\underline{I}_f$ setzt sich aus 12 Komponenten zusammen, die weniger als 15 % der rel. Intensität der nicht aktiven Hauptkomponenten von $\underline{B}_f$ aufweisen. $\underline{B}_f$ enthält 5 der bereits in Fraktion $\underline{A}$ (A. sativa) identifizierten Di - und Tricarbonsäureester; Dihydrohämatinsäuretrimethylester konnte jedoch massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Zwei Verbindungen, deren genaue Strukturen bisher nicht ermittelt werden konnten, weisen ähnliche Strukturmerkmale wie der Hemmstoff aus A. sativa auf und müssen daher bevorzugt als mögliche aktive Komponenten diskutiert werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1) Stokes,P.A.:"Physiological studies of embryo development in Heracleum spondylium L."
Annals of Botany 16, 442 (1952)

2) Stokes,P.:"Temperature and seed dormancy"
Encycl. Pl. Physiol. 15, 746 (1965)

3) Villiers,T.A.; Wareing,P.F.:"Dormancy in fruits of Fraxinus excelsior L."
J. exp. Bot. 15, 359 (1964)

4) Chen,S.S.C.; Varner,J.E.:"Hormones and seed dormancy"
Seed Sci. & Techn. 1, 325 (1973)

5) Pollock,B.M.; Toole,V.K.:"Afterripening, restperiod and dormancy"
Seeds, Yb. Agric. US dept. Agric. 106 (1961)

6) Pollock,B.M.; Olney,H.O.:"Studies on the rest period I"
Plant Physiol. 34, 131 (1959)

7) Olney,H.O.; Pollock,B.M.:"Studies on the rest period II"
Plant Physiol. 35, 970 (1960)

8) Ballard,L.A.:"Physikalische Grenzen der Keimung"
Seed Sci. & Techn. 1, 285 (1973)

9) Crocker,W.:"Role of seed coats in delayed germination"
Bot. Gaz. 42, 265 (1906)

10) Davis,W.E.:"The development of dormancy in seeds of Cocklebur (Xanthium)"
Contr. Boyc., Thompson Inst. Plant. Res. 2, 304 (1930)

11) Shull,C.A.:"The oxygene minimum and the germination of Xanthium seeds"
Bot. Gaz. 52, 453 (1911)

12) Thornton,N.C.:"Factors influencing germination and development of dormancy in Cocklebur seeds"
Contr. Boyc. Thompson Inst. Plant. Res. 7, 477 (1935)

13) Atwood,W.M.:"A physiological study of the germination of Avena fatua"
Bot. Gaz. 57, 386 (1914)

14) Hay,J.R.:"Experiments on the mechanism of induced dormancy in wild oats (Avena fatua)"
Can. J. of Bot. 40, 191 (1962)

15) Berrie,A.M.M.:"The effect of temperature and light on the germination of lettuce seeds"
Physiol. Plant. 19, 1690 (1966)

16) Barnett,J.P.:"Delayed germination of southern pine seeds related to seed coat constraint"
Can. J. of Forest Res. 6, 504 (1976)

17) Sidhu,S.S.; Cavers,P.B.:"Maturity - dormancy relationships in attached and detached seeds of Medicago lupulina L."
Bot. Gaz. 138, 174 (1977)

18) Porter,N.G.; Wareing,P.F.:"The role of oxygen permeabilities of the seed coat in the dormancy of seed of Xanthium pensylvanium Wallr."
J. exp. Bot. 25, 583 (1974)

19) Webb,D.P.; Wareing,P.F.:"Seed dormancy in Acer: Endogenous germination inhibitors and dormancy in Acer pseudoplatanus L."
Planta 104, 115 (1972)

20) Thomas,H.; Webb,D.P.; Wareing,P.F.:
"Seed dormancy in Acer: Maturation in relation to dormancy in Acer pseudoplatanus L."
J. of exp. Bot. 24, 958 (1973)

21) Van Staden."Changes in endogenous cytokinins of lettuce seeds during germination"
Plant Physiol. 28, 222 (1973)

22) Whitmore,F.W.:"Phenolic acids in wheat coleoptile cell walls"
Plant Physiol. 53, 728 (1974)

23) Van Sumere,C.F. et al.:"Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occurring coumarine and phenolics"
Rec. Adv. Phytochem. 4, 165 (1972)

24) Köckemann,A.:"Über eine keimungshemmende Substanz in fleischigen Früchten"
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 52, 523 (1934)

25) Evenari,M.:"Germination inhibitors"
Bot. Rev. 15, 153 (1949)

26) Wareing,P.F.; Foda,H.A.:"Growth inhibitors and dormancy in Xanthium seeds"
Physiol. Plant. 10, 266 (1957)

27) Cornforth,J.W.; Milborrow; Ryback,G.:
"Synthesis of abscissin 2"
Nature 206, 715 (1965)
"Identification and estimation of abscissin 2 in plant extracts by spectropolarimetry"
Nature 210, 627 (1966)

28) Cornforth,J.W.; Rothwell,K.; Wain,R.L.:
"Identification of the yellow lupin growth inhibitor as abscissin 2"
Nature 211, 742 (1965)

29) Garb,S.:"Differential growth inhibitors produced by plants"
Bot. Rev. 27, 422 (1961)

30) Hemberg,T.:"Biogenous inhibitors"
W. Ruhland, ed. Encycl. of Plant Physiol. Vol. 14
Springer Verlag, Berlin 11, 1162 (1961)

31) Ketring, D.L.:"Germination inhibitors"
Seed Sci. & Technol. 1, 305 (1973)

32) Esashi,Y.; Leopold,A.C.:"Dormancy regulation in sub=terranean clover seeds by ethylene"
Plant. Physiol. 44, 1470 (1969)

33) Ketring,D.L.; Morgan,P.W.:"Ethylene as a component of the emamation from germinating peanut seeds and its effect on dormant Virginia type seeds"
Plant. Physiol. 44, 326 (1969)

34) Stewart,E.R.; Freebairn,H.T.:"Ethylene, seed germination and epinasty"
Plant. Physiol. 44, 955 (1969)

35) Berrie,A.M.M.:"Possible role of volatile fatty acids and Abscisic Acid in the dormancy of oats"
Plant. Physiol. 63, 758 (1979)

36) Iwanami,Y.; Iwadare,T.:"Myrmic acids: A group of new inhibitors analogous to Myrmicacin (ß - Hydroxydecanoic acid)"
Bot. Gaz. 140, 1 (1979)

37) Niemann,E.:"Vergleichende Untersuchungen über die Ausscheidung keimungshemmender Stoffe aus Früchten und Samen unter besonderer Berücksichtigung von Foeniculum vulgare MILLER "
Flora 139, 185 (1952)

38) Wilson,M.F.; Bell,E.A.:"Amino acids and ß-aminopropionitrile as inhibitors of germination and growth"
Phytochem. 17, 403 (1978)

39) Schreiber,K.:"Pflanzeninhaltsstoffe mit wachstumsinhibierenden Eigenschaften als Synthesemodelle für die Entwicklung neuer Wachstumsretardantien"
Arch. Züchtungsforsch. 3, 185 (1976)

40) Khan,A.A.; Tao,K.L.; Roe,C.M.:"Applications of chemicals in organic solvents to dry seeds"
Plant Physiol. 52, 79 (1973)

41) Van Overbeck,J. et al.:"Trans - Cinnamic acid as an anti - auxin"
Am. J. Bot. 38, 589 (1951)

42) Chrispeels,M.J.; Varner,J.E.:"Hormonal control of enzyme synthesis on the mode of action of Gibberellic acid and Abscissin in aleurone layers of barley"
Plant Physiol. 42, 398 (1967)

43) Knypl,J.S.:"Kinetin and Gibberellin reversal of the synergistic inhibition of germination of the seeds of kale, Brassica oleracea L. var. acephala by AMO-1618 and coumarin"
Acta Soc. Bot. Pol. 38, 653 (1969)

44) Wareing,P.F.; Saunders,P.F.:"Hormones and dormancy"
Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 261 (1971)

45) Taylorson,R.B.; Hendricks,S.B.:"Dormancy in seeds"
Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 331 (1977)

46) Major,W.; Roberts,I.H.:"Dormancy in cereal seeds 1. The effect of oxygen and respiratory inhibitors"
J. of exp. Bot. 19, 77 (1968)

47) Owen,E.B.:"The storage of seeds for maintance of viability"
Pastures Bullet. 43, Commonw. Agricultural Bureaux (1956)

48) Stajkow, .:"Untersuchungen über die Keimruhe der Samen in Abhängigkeit von ihrem Reifegrad"
Wiss. Arb. höh. landwirtsch. Inst. Wassil Kolaeow - - Plowdiw 6 1957/58; herausg. 1959
Zit. nach Landwirtsch. Zbl., Abt. 2

49) Ludwig,H.;Junges,W.:"Entstehungsbedingungen und Aufhebung der primären Keimruhe bei Braugerste"
Versuchs- und Untersuchungswesen 9 (1963)

50) Belderock,B.:"Studies on dormancy in wheat"
Mitt. int. Verein Samenkontrolle 26 (1961)

51) Atwood,W.M.:"A physiological study of the germination of Avena fatua"
Bot. Gaz. 57, 386 (1914)

52) Simpson,G.M.:"Dormancy studies in seed of Avena fatua 4. The role of Gibberellin in embryo dormancy"
Can. J. Bot. 43, 793 (1965)

53) Zade,A.:"Der Flughafer"
Inaug. Diss. Jena 1 (1909)

54) Kießling,L.:"Untersuchungen über die Keimung der Getreide"
Landwirtsch. Jahrb. (Bayern) 1, 449 (1911)

55) Black,M.:"Dormancy studies in seed of Avena fatua"
Can. J. Bot. 37, 393 (1959)

56) Kommedahl,T. et al.:"Factors affecting dormancy and seedling development in wild oats"
Weeds 6, 12 (1958)

57) Elliott,B.B.; Leopold,A.C.:"An inhibitor of germination and of amylase activity in oat seeds"
Physiol. Plant. 6, 65 (1953)

58) Börner,H.:"Untersuchungen über phenolische Verbindungen aus Getreidestroh und Getreiderückständen"
Die Naturwissenschaften 42, 583 (1955)

59) Börner,H.:"Der papierchromatographische Nachweis von Ferulasäure in wässrigen Extrakten von Getreidestroh und Getreiderückständen"
Die Naturwissenschaften 43, 129 (1956)

60) Börner,H.:"Die Abgabe organischer Verbindungen aus den Karyopsen, Wurzeln und Erntcrückständen von Roggen, Weizen und Gerste und ihre Bedeutung bei der gegenseitigen Beeinflussung höherer Pflanzen"
Beiträge zur Biol. der Pflanzen 33, 33 (1957)

61) Herrmann,K.:"Über Oxyzimtsäuren in Getreideblättern"
Die Naturwissenschaften 45, 111 (1958)

62) Karl,R.:"Untersuchungen an keimungshemmenden Extrakten aus Spelzen von Avena sativa L."
Dissertation, Universität München (1978)

63) Larsen,P.; Peach,K.; Trasey,M.V.:"Growth substances in higher plants"
Modern methods of plant analysis, Springer Verlag B.G.H. Vol. 3, 565 (1955)

64) Mohr,W.:"Über die Qualitätsbeeinflussung von Hafer=erzeugnissen (III). Vorbericht über einen wasserlöslichen Bitterstoff aus Hafer"
Dtsch. Leb.mittelrundschau 49, 127 (1953)

65) Brook,A.J.; Munday,K.C.:"The interaction of phenols, anilins and benzoic acid with Sephadex gels"
J. of Chromatography 47, 1 (1970)

66) Hertel,R.; Ray,P.M.; Dohrmann,U.:
"Specificity of Auxin - binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for Auxin action"
Plant Physiol. 60, 585 (1977)

67) Mc Keown,G.G.; Read,S.I.:"Esterification and gaschromatography of some acids of the tricarboxylic acid cycle"
Analyt. Chem. 37, 1780 (1965)

68) Schmidtlein,H.; Herrmann,K.:"Quantitative analysis for phenolic acids by thinlayerchromatography"
J. of Chromatography 115, 123 (1975)

69) Kefeli,V.I.:"Natural plant growth inhibitors and phytohormones"
Dr. W. Junk b.v. Publ. The Hague/Boston (1978)

70) Kotaka,S.; Krüger,A.P.; Andriese,P.C.:"Effect of air ions on IAA content of barley seedlings"
Plant and Cell Physiol. 6, 711 (1965)

71) Sondheimer,E. et al.:"Metabolism of hormones during seed-germination and dormancy IV"
Plant Physiol. 54, 803 (1974)

72) Petrova,V.N.; Nikolaeva,M.G.:"The role of native abscisic acid in the dormancy of seeds of tartar maple"
Fiziol. Ravt. 21, 343 (1974)

73) Hiraja,K. et al.:"Isolation and characterisation of Gibberellins in mature seeds of Phaseolus vulgaris"
Agric. Biol. Chem. 38, 2511 (1974)

74) Hemberg,T.:"Studies on the balance between free and bound auxin in germinating maize"
Physiol. Plant. 8, 418 (1955)

75) Whitmor,F.W.:"Phenolic acids in wheat coleoptile cell walls"
Plant Physiol. 53, 728 (1974)

76) Tipton,C.L. et al.:"Cyclic hydroxamic acids and related compounds from Maize"
Biochemistry 6, 2866 (1967)

77) Colvin,R.R.; Witter,D.E.:"On the inhibition of Cellulose biosynthesis by Coumarin
Plant Sci. Lttrs. 18, 33 (1980)

78) Neish,A.C.:"Coumarins, phenylpropanes and lignins"
J.Bonnerand J.E.Varner ed. Plant Biochem. Acad. Press, New York 581 (1965)

79) Johnson,C.; Brannon,D.R.:"A phytoalexin of Pastinaca sativa root"
Phytochemistry 12, 2961 (1973)

80) Wareing,P.F.:"Endogenous inhibitors in seed germination and dormancy"
Handbuch d. Pflanzenphysiol. Bd. XV/2,906 (1965)

81) Mayer,A.M.; Poljakoff-Mayber:"The germination of seeds"
Oxford, Pergamon Press (1963)

82) Cerchez,V.:"Sur l'emploi des alcoolates de Mg dans la préparation des éthers - oxydes"
Bull. Soc. Chim. France 43, 762 (1928)

83) Schildknecht,H.; Koob,K.:
"The first insect herbicide"
Angew. Chem. int. Ed. 10, 124 (1971)

84) Caussanel,J.P.; Kunesch,G.:
"Étude Qualitative et Quantitative des Inhibiteurs de Croissance Présents dans les Exsudats de Racines de Chénopode blanc au Début de sa Floraison en Culture Hydroponique et sous Conditions Contrôlées"
Z. Pflanzenphysiol. 93, 229 (1979)

85) Franssen,J.M. et al.:"Note on the biological activities of Xanthoxin - like substances"
Z. Pflanzenphysiol. 94, 155 (1979)

86) Tamura,S.; Nagao,M.:"Synthesis and biological activities of new plant growth inhibitors related to Abscisic acid"
Agric. Biol. Chem. 34, 1393 (1970)

87) Isogai,Y.; Komoda,Y.; Okamoto,T.:
Chem.& Pharm.Bull. 18, 1872 (1970)

88) Koshimizu,K. et al.:
Agric. Biol. Chem. 30, 941 (1966)

89) Zemanova,A.:"Příspevek ke studiu Dormance ovsa Hluchého"
Acta Universitatis Agriculturae 1285, 957 (1975)

90) Venis,M.A.; Watson,P.J.:"Naturally occuring modifiers of Auxin-receptor interaction in corn: Identification as Benzoxazolinones"
Planta 142, 103 (1978)

91) Jayachandran-Nair,K.; Sidhar,R.:"Phenolic compounds in rice husk"
Biologia plantarum 17, 318 (1975)

92) Thimann,K.V.; Bonner,W.D.:"Inhibition of plant growth by protoanemonin and coumarin,and its prevention by BAL"
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 35, 272 (1949)

93) Spiteller,M.; Spiteller,G.:"Trennung und Charakterisierung saurer Harnbestandteile"
J. of Chromatography 164, 253 (1979)

94) Eliasson,B.; Linstedt,S.; Göran,S.:
"Aliphatic medium chain tricarboxylic acids in rat urine"
J. Lipid Research 17, 637 (1976)

95) Tetjurew,W.A.:"Über das sogenannte ´Blastochinon`"
Planta 32, 211 (1941)

96) Takahashi,N. et al.:"Effects of some organic acids on the dark germination of tobacco seeds"
Bot. Mag. Tokyo 75, 163 (1962)

97) Ballin,G.:"Kritische Bemerkungen zur biologischen Auxinbestimmung"
Konference ve starem smaokovci, Abstracts, Praha 13 (1967)

98) Boyarkin,A.N.:"A new method for quantitative estimation of growth substances"
Proc. Acad. Science USSR 57, 197 (1947)

99) Boyarkin,A.N.:"Certain modifications of the method for quantitative estimation of growth substance activity"
M., `Nanka´ Publishers, 13 (1948)

100) Thakur,M.L.:"Phenolic growth inhibitors isolated from dormant buds of sugar maple (Acer Saccharum Marsh)"
J. of exp. Bot. 28, 795 (1977)

101) Budzikiewicz,H.; Djerassi,D.H.; Williams:
"Interpretation of mass spectra of organic compounds"
Holden Day, San Francisco (1964)

102) Fischer,H.; Wenderoth,H.:"Zur Kenntnis von Chlorophyll"
Liebigs Ann. Chemie 537, 170 (1939)

103) Ficken,G.E.; Jones,R.B.; Linstead,R.P.:
"Chlorophyll and related compounds IV. The position of the extra hydrogens in Chlorophyll. The oxidation of Pyrophaeophorbide A"
J. Chem. Soc. (London) 1956, 2272, 2280

104) Brockmann jr.,H.; Kleber,J.:"Bacteriochlorophyll B"
Angew. Chemie 81, 626 (1969)

105) Brockmann jr.,H.:"Zur absoluten Konfiguration des Bacteriochlorophylls"
Angew. Chemie 80, 234 (1968)

106) Brockmann jr.,H. et al.:"The absolute configuration of natural (-)Stercobilin and other urobilinoid compounds"
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2141 (1971)

107) Apsimon,J.W. et al.:"The structure of Ergoflavin"
Proc. Chem. Soc. (London) 1963, 209

108) Henry,T.A.; Paget,H.:"Action of Beckmann'sChromic acid mixture on some monocyclic terpenes"
J. Chem. Soc. (London) 1928, 70, 18

109) Bode,J. Brockmann jr.,H.:"Substituierte Bernsteinsäuren IV. Zur relativen Konfiguration 2.3.-dialkylierter Bernsteinsäuren"
Chem. Berichte 105, 34 (1972)

110) Morgan,S.F.; Berrie,A.M.M.:"Development of dormancy seed maturation in Avena ludoviciana, winter wild oat"
Nature 228, 1225 (1970)

111) Knobloch,G.:"Konstitution und absolute Konfiguration natürlicher Tetrapyrrolverbindungen"
Dissertation Techn. Universität Braunschweig (1972)

112) Golden,J.H.; Linstead,R.P.; Whitham,G.H.:
"Chlorophyll and related compounds VII. The structure of Bacteriochlorophyll"
J. Chem. Soc. (London) 1958, 1725

113) Brown,A.G.:"Versimide, a metabolite af Aspergillus versicolor"
J. Chem. Soc. (London) 1970, 2572

114) Lee,T.T. et al.:"New phenolic inhibitors of the Peroxidase--catalysed oxidation of Indole-3-acetic acid"
Phytochemistry 19, 2277 (1980)

115) Florêncio,H.; Heerma,W.; Dijkstra,G.:"The mass spectra of dimethoxytoluenes"
Org. Mass Spectrometry 12, 269 (1977)

116) Berrie,A.M.M.et al.:"The occurence and function of short chain length fatty acids in plants"
Plant Sci. Letters 6, 163 (1975)

117) Koshimizu,K. et al.:"Isolation of (+)Abscisyl-β-D-gluco=pyranoside from immature fruit of Lupinus luteus"
Agricult. Biol. Chem. 32, 789 (1968)

118) Milborrow,B.V.:"The metabolism of Abscisic acid"
J. of Exp. Bot. 21, 17 (1970)

119) Mandava,N.B.:"Plant growth substances"
Mandava,N.B. edit. ACS Symposium Series No. 111 (1979)

120) Wanner,H.; Santosa; Stocker,H.:"Different effects of long chain fatty acids on seed germination"
Biochem. Physiol. Pflanzen 171, 391 (1977)

121) Tipton,C.L. et al.:"Cyclic hydroxamic acids and related compounds from Maize"
Biochemistry 6, 2866 (1967)

122) Hofmann,J.; Hofmanova,O.:"1.4-Benzoxazinderivatives in plants. Sephadex fraction and identification of a new glucoside"
Europ. J. Biochem. 8, 109 (1969)

123) Woodward,M.D.; Corcurea,L.C.:"Decomposition of 2.4-Dihydroxy-2H-1.4-Benzoxazin-3(4H)-one in aqueos solution"
Plant Physiol. 61, 796 (1978)

124) Virtanen,A.I.; Hietala,P.K.:
Suomen Kemistilehti 28B, 165 (1955)
Acta Chem. Scand. 9, 1543 (1955)

125) Smissman,E.E.; La Pidius,J.B.; Beck,S.D.:
"Corn plant resistance factor"
J. Am. Chem. Soc. 79, 4697 (1957)

126) Corcuera,L.J.; Woodward,M.D. et al.:
"2,4-Dihydroxy-7-methoxy- H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, an inhibitor from Zea mays with differential activity against soft rotting Erwinia species"
Plant Physiol. 61, 791 (1978)

127) Klun,J.A.; Brindley,T.A.:"Role of 6-Methoxybenzoxazolinone in inbred resistance of host plant (maize) to first - brood larvae of European corn borer"
J. Econ. Entomol. 59, 711 (1966)

128) Hamilton,R.H.:"Tolerance of several grass species to 2-Chloro-s-triazine herbicides in relation to degradation and content of benzoxazinone derivates"
J. Agric. Food Chem. 12, 14 (1964)

129) Quail,P.H.; Carter,O.G.:Dormancy in seeds of Avena ludoviciana and Avena fatua"
Aust. J. Agric. Research 20, 1 (1969)

130) Morgan,S.F.; Berrie,A.M.M.:"Development of dormancy during seed maturation in Avena ludoviciana (winter wild oat)"
Nature 228, 1225 (1970)

131) Tietz,D. et al.:"Identification by gas chromatography - - mass spectrometry of Phaseic acid and Dihydrophaseic acid and characterization of further Absisic acid metabolites in pea seedlings"
Planta 147, 168 (1979)

132) Gray,C.H.; Nicholson,D.C.:"The chemistry of bile pigments. The structure of Stercobilin and d-Urobilin"

J. chem. Soc. 1958, 3085 (1958)

Lebenslauf

09.01.1954	geboren in Ohrtermersch (Niedersachsen) als Tochter des Landwirts Erich Lohaus und dessen Ehefrau Lilli, geb. Nordemann
1960 - 1964	Volksschule Ohrtermersch
1964 - 1972	Artland - Gymnasium Quakenbrück
Juni 1972	Abitur
Nov. 1972	Beginn des Studiums der Lebensmittelchemie an der RWTH Aachen
Juni 1975	1. Staatsexamen an der RWTH Aachen
Nov. 1975	Übertritt an die Ludwig - Maximilian - Universität, München
Juni 1977	2. Staatsexamen
Sept. 1977	Beginn der Dissertation am Botanischen Institut der Universität München unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger